



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

CICLO XXV

COORDINATORE Prof. Giacomo Laffi

**RUOLO DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI UMANE
NELLA REGOLAZIONE DELLE FUNZIONI EFFETTRICI DEI
LINFOCITI T E LINFOCITI B**

Settore Scientifico Disciplinare MED/04

Dottorando

Dott.ssa Querci Valentina

Tutore

Prof. Annunziato Francesco

Coordinatore

Prof. Laffi Giacomo

Anni

2010/2013

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. RIASSUNTO..... | 3 |
| 2. INTRODUZIONE..... | 5 |
| 2.1 Il sistema immunitario..... | 5 |
| 2.1.1 Immunità innata..... | 5 |
| 2.1.2 Immunità adattiva..... | 6 |
| 2.1.3 Linfociti T..... | 8 |
| 2.2 Le cellule staminali mesenchimali..... | 9 |
| 2.2.1 Le cellule staminali mesenchimali come cellule ad attività immunoregolatoria | 11 |
| 2.3 I tumori..... | 13 |
| 2.3.1 Le neoplasie ed il sistema immunitario..... | 14 |
| 2.3.2 Le neoplasie e le cellule staminali mesenchimali..... | 16 |
| 2.4 Tumore testa-collo a cellule squamose (HNSCC)..... | 19 |
| 2.4.1 MSCs in HNSCC..... | 20 |
| 2.4.2 Reclutamento delle MSCs a livello di HNSCC..... | 20 |
| 2.4.3 MSCs e progressione HNSCC..... | 21 |
| 3. MATERIALI E METODI..... | 24 |
| 3.1 Pazienti..... | 24 |
| 3.2 Reagenti ed anticorpi..... | 24 |
| 3.3 Purificazione e coltura delle cellule mesenchimali stromali ottenute dai campioni di biopsia tumorale..... | 25 |
| 3.4 Purificazione e coltura delle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo | 26 |
| 3.5 Purificazione dei linfociti T CD4+..... | 26 |
| 3.5.1 Separazione su gradiente di densità di cellule mononucleate | 26 |
| 3.5.2 Separazione immunomagnetica dei linfociti T CD4+..... | 26 |
| 3.6 Analisi citofluorimetrica..... | 27 |
| 3.6.1 Analisi citofluorimetrica su cellule ottenute da campioni tumorali..... | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.6.2 Analisi citofluorimetrica su cellule T CD4+..... | 28 |
| 3.7 Saggio di differenziazione delle cellule mesenchimali stromali tumorali | 28 |
| 3.7.1 Colorazione adipogenica ed osteogenica. | 28 |
| 3.8 Real-time quantitative RT-PCR. | 29 |
| 3.9 Test di proliferazione dei linfociti T CD4+. | 29 |
| 3.10 Analisi statistica. | 30 |
| 4. RISULTATI | 31 |
| 4.1 Caratterizzazione immunofenotipica dei campioni ottenuti da biopsie tumorali di pazienti affetti da HNSCC..... | 31 |
| 4.2 Le cellule stromali aderenti derivate <i>in vitro</i> da HNSCC condividono proprietà fenotipiche e staminali con le cellule staminali mesenchimali di midollo osseo ottenute da pazienti sani. | 31 |
| 4.3 Le Tumor-MSC inibiscono, <i>in vitro</i> , la proliferazione delle cellule T CD4+ attraverso indolamina 2,3 diossigenasi (IDO). | 33 |
| 4.4 La frequenza delle cellule stromali CD90+ in HNSCC correla direttamente con le dimensioni del tumore..... | 34 |
| 5. DISCUSSIONE. | 35 |
| 6. FIGURE E TABELLE. | 38 |
| 7. BIBLIOGRAFIA. | 48 |

1.RIASSUNTO

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells, MSCs) sono cellule multipotenti del midollo osseo che possono differenziare verso diversi tipi cellulari; esse sono infatti in grado di differenziare sia in cellule mesenchimali come osteociti, condrociti e adipociti che in cellule non mesenchimali quali neuroni e astrociti.

Il loro potenziale differenziativo, oltre alla loro bassa immunogenicità e al loro facile reperimento, offre diverse prospettive per l'utilizzo terapeutico delle cellule mesenchimali nella medicina rigenerativa per la riparazione dei tessuti, come il tessuto osseo, il tessuto nervoso ed il miocardio. Oltre al loro possibile utilizzo per la rigenerazione-riparazione dei tessuti, negli ultimi anni è stato dimostrato che le MSCs sono in grado di interagire con cellule effettrici dell'immunità innata e acquisita (cellule dendritiche, cellule natural killer, linfociti T e linfociti B) esplicando un'attività di tipo immunoregolatorio. Questa capacità viene esercitata da MSCs indifferenziate ed è ormai ampiamente dimostrata sia in studi *in vitro* che in modelli *in vivo*; per queste caratteristiche le MSCs sono state utilizzate anche in trials clinici nel trattamento della Graft-Versus-Host Disease (GVHD) e della sclerosi multipla. Tali proprietà immunoregolatrici sono dovute a vari meccanismi molecolari, tra cui l'attività dell'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (IDO).

Recentemente è stata dimostrata la presenza delle MSCs a livello dello stroma tumorale dove giocano un importante ruolo nel promuovere la crescita tumorale invasiva e anche le metastasi a distanza. Tali cellule, infatti oltre ad avere proprietà immunosoppressive, sono capaci di differenziare in miofibroblasti associati al tumore, di promuovere l'angiogenesi e la linfogenesi e di conferire resistenza ai trattamenti antitumorali.

Uno dei tumori in cui è ipotizzabile la presenza delle MSCs, essendo caratterizzato da un importante infiltrato leucocitario, da un abbondante presenza di miofibroblasti nello stroma e da un alto tasso di recidive è il tumore testa collo a cellule squamose (HNSCC).

Tale tumore è il sesto fra i più comuni tumori maligni a livello mondiale ed oltre il 90% sono carcinomi a cellule squamose che colpiscono, soprattutto, la mucosa del tratto aerodigestivo superiore.

Lo scopo di questo studio è stato proprio quello di valutare la presenza di MSCs nello stroma tumorale di HNSCC, di studiare la loro attività immunosoppressiva *in vitro* su linfociti T stimolati policlionalmente e di verificare se la loro frequenza correlasse con le dimensioni del tumore. Partendo da una popolazione cellulare eterogenea (cellule epiteliali, fibroblasti, leucociti, cellule endoteliali) ottenuta da campioni di biopsia tumorale di pazienti affetti da HNSCC, sono state purificate le cellule aderenti stromali sfruttando la loro capacità di aderire alla plastica e dopo circa 3 settimane di coltura è stata ottenuta una popolazione cellulare di aspetto fibroblastoide omogenea, con fenotipo compatibile con quello delle MSCs (CD44+, CD90+, CD73+, CD105+, CD45-, CD14-, CD34- e CD31-). Fase successiva dello studio è stata, quindi, quella di valutare la capacità di queste cellule di differenziare *in vitro* verso adipociti ed osteoblasti per testare la loro natura staminale. In seguito abbiamo studiato la loro capacità di inibire, in modelli *in vitro*, la proliferazione di linfociti T CD4+ attivati andando anche a verificare se la molecola IDO fosse coinvolta nell'immunosoppressione. Dai risultati ottenuti è emerso che le cellule aderenti stromali presenti nei tumori HNSCC si comportano in maniera analoga alle BM-MSCs, essendo capaci di differenziare *in vitro* verso adipociti ed osteoblasti dopo 21 giorni di induzione con medium-lineage specifici ed essendo in grado di sopprimere *in vitro* la proliferazione dei linfociti T CD4+ attraverso IDO. Basandoci su questi dati, abbiamo ipotizzato che anche le cellule stromali tumorali potessero possedere un'attività immunoregulatoria *in vivo* come già dimostrato nelle BM-MSCs. Per verificare questa ipotesi abbiamo valutato la correlazione tra la frequenza delle cellule stromali presenti nei campioni tumorali e le dimensioni del tumore; da tale analisi è emersa una correlazione diretta e significativa tra i due parametri, suggerendo che tali cellule favoriscono la crescita della neoplasia. Inoltre, abbiamo osservato una correlazione inversa e significativa tra le cellule stromali tumorali ed i leucociti totali infiltranti il tumore, suggerendo così che le cellule stromali tumorali possono esercitare anche un'attività immunoregulatoria *in vivo*.

I dati ottenuti ci portano ad ipotizzare che le cellule stromali tumorali potrebbero favorire la crescita del tumore, probabilmente inibendo direttamente o indirettamente la risposta immune. Riteniamo necessario confermare questi dati con un maggior numero di pazienti e correlare la frequenza delle tumor-MSCs con la storia clinica della malattia per un adeguato periodo di follow-up.

2. INTRODUZIONE

2.1 Il sistema immunitario

Il sistema immunitario è un complesso di cellule e fattori solubili indispensabili per proteggerci da tutti i potenziali agenti infettivi che, nel corso della vita, possono venire a contatto con il nostro corpo. Tale sistema è costituito da un vasto assortimento di cellule, fattori solubili e barriere fisiche che lavorano in concerto per dare vita alla risposta immunitaria. Tuttavia questi stessi meccanismi di difesa, quando non sono adeguatamente controllati, possono essere responsabili di insorgenza di danno tissutale. Si distinguono due categorie di immunità: immunità innata o naturale e immunità specifica o acquisita [1, 2].

2.1.1 Immunità innata

L'immunità innata (anche chiamata immunità naturale) è la prima linea di difesa del sistema immunitario. E' filogeneticamente la più antica ed è conservata durante l'evoluzione della specie. Molte componenti dell'immunità innata sono presenti prima dello stabilirsi dell'infezione e costituiscono una serie di meccanismi di difesa che non sono specifici per un particolare patogeno ma includono componenti molecolari e cellulari che riconoscono classi di molecole specifiche dei patogeni [3].

L'immunità innata ha tre importanti caratteristiche:

1. è la prima risposta dell'ospite contro i microrganismi ed è capace di prevenire l'infezione e, qualche volta, di eliminare i microrganismi;
2. i meccanismi effettori della risposta innata sono spesso usati per eliminare i microrganismi durante la risposta adattiva;
3. l'immunità innata stimola la risposta adattiva e la polarizza per ottenere la miglior risposta contro i microrganismi.

Le principali componenti dell'immunità innata sono:

- barriere fisiche e chimiche, come gli epitelii e le mucose con le sostanze antimicrobiche prodotte dalle superfici cellulari;
- cellule ad attività fagocitica, come i neutrofili, i macrofagi e le NK;
- le proteine del sangue, come i fattori del complemento e mediatori della flogosi;
- citochine, che sono proteine che regolano molte attività del sistema immunitario.

Questi elementi reagiscono solo a microbi e rispondono essenzialmente nello stesso modo ad infezioni ripetute. Il meccanismo dell'immunità innata fornisce un'iniziale difesa contro le infezioni ma molti patogeni si sono evoluti per resistergli. Quindi la loro eliminazione richiede il coinvolgimento di una seconda linea di difesa, l'immunità adattiva.

2.1.2 Immunità adattiva

L'immunità adattiva rappresenta la seconda linea di difesa del sistema immunitario. È filogeneticamente più giovane dell'immunità innata, infatti è presente solo nei vertebrati e raggiunge la più alta complessità nei mammiferi. Essa fa sì che l'organismo risponda in maniera specifica ad un particolare patogeno. Le caratteristiche che definiscono l'immunità adattiva (o specifica) sono la specificità per molecole distinte e la capacità di “ricordare” e rispondere più vigorosamente ad esposizioni ripetute allo stesso patogeno. Il sistema immunitario adattivo è capace di riconoscere e rispondere ad una grande varietà di sostanze microbiche e non. Le sostanze che inducono la risposta adattiva sono chiamate *antigeni*.

Le principali caratteristiche delle risposte immunitarie specifiche sono:

- specificità: epitopi antigenici differenti inducono risposte diverse;
- diversificazione: grazie alla quale il sistema immunitario risponde ad una vasta gamma di antigeni;
- non reattività al self: previene il danneggiamento dell'organismo reagendo solo verso antigeni estranei;
- specializzazione: genera risposte ottimali per contrastare vari patogeni;
- autolimitazione: la risposta si attenua nel tempo per evitare danni all'organismo;
- memoria: porta ad una risposta più efficace ed intensa ogni qualvolta l'organismo venga esposto ad uno stesso antigene.

In base alle componenti implicate nella risposta immunitaria ed al tipo di patogeno incontrato è possibile distinguere due categorie di immunità specifica, ovvero l'*immunità umorale* e l'*immunità cellulare*.

L'immunità umorale è mediata da anticorpi (o immunoglobuline, Ig), che sono proteine secrete dai linfociti B e che si trovano nel sangue e nelle secrezioni mucosali. L'immunità umorale è il principale meccanismo di difesa contro microbi extracellulari e le loro

tossine poiché gli anticorpi secreti possono legarli in maniera specifica e facilitarne la loro eliminazione.

Gli anticorpi sono proteine costituite da quattro catene: due pesanti e due leggere. Entrambi questi due differenti tipi di catene sono formati da una regione costante, che definisce la classe dell'Ig della catena, e da una regione variabile, che definisce la specificità per l'antigene. Esistono cinque classi di anticorpi, che differiscono per il frammento costante della catena pesante: A, D, E, G e M. Il frammento costante della catena leggera può essere k o lambda.

L'immunità cellulare o cellulo-mediata è mediata dai linfociti T e coinvolge vari tipi cellulari nell'eliminazione dell'antigene.

Sia le cellule T che B derivano da un progenitore comune, la cellula staminale ematopoietica, che risiede nel midollo osseo. Durante la differenziazione, le cellule T immature lasciano il midollo osseo e raggiungano il timo, dove completano la maturazione. I linfociti B invece completano la loro differenziazione nel midollo osseo. Sia i linfociti T che i linfociti B hanno recettori espressi in membrana, che sono importanti per il riconoscimento antigene-specifico. Le cellule B hanno il BCR (B cell receptor) mentre le cellule T hanno il TCR (T cell receptor). Il BCR è costituito da un'immunoglobulina di membrana che può essere di classe D (IgD) o di classe M (IgM); esso non è secreto ma è legato alla membrana cellulare. È capace di riconoscere ogni classe di antigene biologico: metaboliti, carboidrati, lipidi, ormoni, strutture macromolecolari come polisaccaridi, fosfolipidi, acidi nucleici e proteine. La porzione antigenica di una molecola che è riconosciuta dall'anticorpo viene chiamata epitopo.

Il TCR è differente ma strutturalmente correlato al BCR: è costituito da due catene ed ognuna di loro ha una porzione costante e variabile. Questo recettore è un eterodimero formato da due catene polipeptidiche transmembrana legate tra loro tramite due ponti disolfuro. Il TCR esiste in due forme differenti: TCR $\alpha\beta$, che è espresso sulla maggioranza dei linfociti, ed il TCR $\gamma\delta$.

I segnali biochimici innescati dal riconoscimento dell'antigene non sono trasdotti dal TCR stesso, ma da un complesso multimerico ad esso associato, formato da cinque proteine integrali di membrana non-polimorfe; tale complesso prende il nome di CD3.

Un'importante differenza tra il BCR ed il TCR è che il primo riconosce antigeni solubili nella loro struttura nativa, mentre il secondo riconosce gli antigeni solo dopo che questi sono stati internalizzati, processati ed esposti sulla superficie da altre cellule. Queste ultime “presentano” l'antigene processato associato a proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), del quale esistono due forme: MHC di classe I e MHC di classe II. L'MHC di classe I è espresso da tutte le cellule nucleate dell'organismo ed è associato ad antigeni di origine endocellulare (peptidi virali o tumorali), l'MHC di classe II è espresso solo da cellule specializzate, chiamate APC (Antigen Presenting Cells, ad es. cellule dendritiche, cellule di Langherans, monociti) [4] e si associa ad antigeni extracellulari. Le molecole MHC di classe I e MHC di classe II interagiscono con due differenti classi di linfociti T: i linfociti T CD4⁺ ed i linfociti T CD8⁺. Le cellule T CD4⁺ riconoscono il complesso MHC-II/peptide mentre le cellule T CD8⁺ riconoscono il complesso MHC-I/peptide.

L'attivazione dei linfociti porta alla generazione di numerosi meccanismi che cooperano per eliminare il patogeno. Questa eliminazione spesso richiede il coinvolgimento di cellule che sono comunemente chiamate cellule effettrici, così come i linfociti T attivati, i fagociti e altri leucociti. L'eliminazione degli antigeni è seguita da una fase di autolimitazione, nei quali i linfociti antigeni-specifici muoiono e l'omeostasi è ripristinata. Tuttavia, le cellule memoria generate dopo l'iniziale attivazione dei linfociti possono sopravvivere per anni dopo l'infezione.

2.1.3 Linfociti T

I linfociti T, principali autori della risposta specifica cellulo-mediata, sono cellule effettrici del sistema immunitario caratterizzate dall'espressione del complesso TCR-CD3 antigene specifico [5].

Come precedentemente citato, nell'ambito della grande famiglia dei linfociti T è possibile distinguere due ulteriori sottopopolazioni, i linfociti T CD4⁺ e CD8⁺, definiti sia fenotipicamente, dall'espressione mutualmente esclusiva delle molecole CD4 e CD8 (molecole corecettori), sia funzionalmente, per le diverse attività effettrici.

I linfociti CD4⁺ sono anche detti linfociti T helper (Th) in riferimento alla loro attività funzionale mirata a sostenere ed attivare altre cellule del sistema immunitario per permettere ed agevolare l'eliminazione del patogeno. Questa popolazione linfocitaria è importante quindi per amplificare la risposta immunitaria, inducendo la secrezione di

anticorpi da parte dei linfociti B, attivando cellule effettrici (macrofagi, cellule natural killer e granulociti) e reclutando altre cellule del sistema immunitario a livello della zona danneggiata.

Da sottolineare il fatto che, sebbene in linea generale tutte le cellule con funzioni helper appartengono alla popolazione CD4+, non tutte le CD4+ hanno funzione helper [6]. Da un punto di vista funzionale si distinguono due principali tipologie di linfociti T helper: i linfociti T CD4+ effettori ed i linfociti T CD4+ regolatori. I primi sono coinvolti nella risposta immunitaria al patogeno, i secondi in processi di modulazione della risposta immunitaria per evitare che questa possa diventare eccessiva e dannosa per l'organismo o sfociare in patologie autoimmuni.

Nell'ambito dei linfociti T CD4+ effettori si possono distinguere diverse sottopopolazioni linfocitarie in base al profilo di produzione di citochine: le cellule T helper 1 (Th1), le cellule T helper 2 (Th2) [7 e 8] e le cellule T helper 17 (Th17) [9-11].

I linfociti T CD8+, anche conosciuti come linfociti citotossici (CTL), svolgono un'azione citolitica nei confronti di cellule bersaglio, ovvero cellule self che presentano sulla loro superficie antigeni estranei associati a molecole MHC di classe I. Tale azione citolitica si esplica attraverso diversi meccanismi quali degranulazione di sostanze citolitiche (perforine, granzimi) ed induzione di apoptosi tramite Fas-ligando.

La precedente distinzione funzionale e fenotipica non è però da considerarsi una suddivisione netta priva di eccezioni, infatti sono stati descritti anche casi in cui proprietà citolitiche sono state individuate a carico della popolazione T CD4+ [12] e allo stesso modo sono stati individuati linfociti T CD8+ con attività helper [13].

2.2 Le cellule staminali mesenchimali

Le cellule staminali mesenchimali (Mesenchymal Stem Cells - MSCs) sono cellule multipotenti del midollo osseo che possono differenziare verso diversi tipi cellulari; esse sono infatti in grado di differenziare sia in cellule mesenchimali come osteociti, condrociti e adipociti che in cellule non mesenchimali quali neuroni e astrociti. La frequenza di MSCs nel tessuto midollare dell'adulto, stimata in seguito a studi condotti su colture cellulari in vitro delle cellule di tessuto midollare, è di circa 0.01% [14-17].

Le MSCs sono state isolate da diverse specie animali [18-20] e da diversi tessuti; oltre al midollo osseo si possono trovare nell'osso, nel sangue periferico, nel tessuto adiposo, nel

cordone ombelicale, nel muscolo, nel derma, nel pancreas, nel fegato, nel polmone, nel liquido amniotico e in altri tessuti fetali [21-23].

Le MSCs attualmente sono identificate grazie ad una combinazione di caratteristiche morfologiche, fisiche, fenotipiche e funzionali, poiché non è stata ancora individuata una molecola (marker cellulare), o una combinazione di esse, selettivamente espressa da tali cellule [24 e 25]. *In vitro* tali cellule si comportano come cellule staminali, in quanto hanno un vasto potenziale proliferativo e clonogenico, e possono dare origine a una progenie differenziata. Va sottolineato che attualmente non è stata ancora dimostrata *in vivo*, a livello di singola cellula, la loro capacità di rigenerazione o di conservazione di un tessuto [18, 25].

Le MSCs hanno la capacità di crescere in adesione [26-29], morfologicamente appaiono affusolate (simili a fibroblasti) ed esprimono sulla membrana cellulare molecole di adesione quali il CD105, CD29, CD62, CD90, CD44, CD49e, CD166, LFA-3, CD106 (VCAM-1) CD54 (ICAM-1), SH3, SH4 (CD73). Attraverso queste molecole, le MSCs interagiscono con le cellule staminali ematopoietiche influenzandone “l’homing” e la differenziazione, probabilmente grazie alla loro capacità di produrre fattori di crescita e di indurre l’espressione di recettori implicati nel traffico cellulare [30]. Attualmente, la comunità scientifica concorda sul fatto che queste cellule non esprimono markers di cellule endoteliali o ematopoietiche, quali il CD34, CD45, CD31 e CD11c mentre esprimono MHC di classe I a bassa intensità [16, 17 e 30]. Dal momento che le MSCs hanno la capacità di differenziare in tessuto osseo, adiposo e cartilagineo con stimoli adeguati, l’osteogenesi, la condrogenesi e l’adipogenesi rimangono ad oggi i test funzionali più utili per identificarle [31].

Le MSCs sono facilmente espandibili in coltura, grazie al loro intenso ritmo proliferativo; tuttavia è necessario tenere in considerazione il fatto che dopo vari cicli replicativi *in vitro*, queste cellule perdono parte del loro potenziale staminale, acquisendo un fenotipo sempre più differenziato. Il loro potenziale differenziativo, oltre alla loro bassa immunogenicità e al loro facile reperimento, offre diverse prospettive per l’utilizzo terapeutico delle cellule mesenchimali nella medicina rigenerativa per la riparazione di tessuti, come il tessuto osseo, il tessuto cartilagineo, il tessuto nervoso e il miocardio [32-34].

Oltre al loro possibile utilizzo per la rigenerazione-riparazione dei tessuti, negli ultimi anni è stato dimostrato che le MSCs sono in grado di interagire con cellule effettrici della immunità innata e acquisita (cellule dendritiche, cellule natural killer, linfociti T e linfociti B, sebbene per questi ultimi i dati presenti in letteratura sono ancora contraddittori) esplicando un'attività di tipo immunoregulatorio.

Oltre al loro ruolo nella rigenerazione-riparazione dei tessuti e nell'immunoregolazione è anche stato documentato che le MSCs stimolano l'angiogenesi durante l'ischemia e sono capaci di migrare al tessuto danneggiato. Tutte queste caratteristiche fanno delle MSCs ottime candidate per il trattamento di molte malattie. Tuttavia, è stato anche dimostrato che tali cellule sono coinvolte nello sviluppo dei tumori.

2.2.1 Le cellule staminali mesenchimali come cellule ad attività immunomodulatoria

La capacità immunomodulatoria viene esercitata da MSCs indifferenziate ed è ormai ampiamente dimostrata sia in studi *in vitro* che in modelli *in vivo*; per queste caratteristiche le MSCs sono state utilizzate anche in trials clinici nel trattamento della Graft-Versus-Host Disease (GVHD) e della sclerosi multipla [35 e 36].

Gli effetti immunoregulatori delle MSCs osservati rendono tali cellule ottime candidate per un approccio terapeutico cellulare volto ad indurre tolleranza immunitaria. Gli approcci convenzionali per controllare le risposte immunitarie nei disordini autoimmuni e le indesiderate allorisposte nei trapianti d'organo si basano sulla soppressione non specifica del sistema immunitario allo scopo di inibire le cellule T e B effettrici/memoria patogenetiche specifiche della malattia; nonostante la soppressione cronica migliori le manifestazioni in molti pazienti con disordini autoimmuni ed il controllo del rigetto del trapianto, questo approccio non offre un potenziale curativo e spesso porta ad importanti effetti collaterali dovuti alla tossicità dei farmaci e ad un aumentato rischio di infezioni e neoplasie, per cui la possibilità di usare un approccio più mirato risulta di estrema importanza. I primi studi riguardanti le proprietà immunoregatorie delle MSCs sono stati condotti su modelli murini nei quali è stato dimostrato che le MSCs sono in grado di inibire i linfociti T sopprimendone la proliferazione [37-40]. La soppressione esercitata dalle MSCs non sembra coinvolgere meccanismi di induzione dell'apoptosi cellulare o di anergia; infatti se ristimolati in assenza di MSCs i linfociti T soppressi proliferano di nuovo efficientemente. L'inibizione si verifica sia nei confronti dei linfociti T CD8+ che

CD4+[30]. L'effetto inibitorio è correlato al numero di MSCs rispetto ai linfociti T effettori; è cioè necessario un rapporto minimo di MSCs/linfociti T per ottenere la soppressione della risposta T-cellulare [39].

L'azione immunoregulatoria delle MSCs è indipendente dal loro MHC. Infatti, l'inibizione dei linfociti ottenuti da sangue periferico (PBLs, Peripheral Blood Lymphocytes) e stimolati con PBLs ottenuti da altri 5 diversi donatori, si verifica sia quando le MSCs provengono dallo stesso soggetto che ha donato i linfociti, sia quando le MSCs appartengono ad un altro individuo, senza rilevanti differenze [39].

I precisi meccanismi alla base degli effetti immunomodulatori delle MSCs non sono a tutt'oggi del tutto chiari e sembrano coinvolgere molteplici pathways. Tra questi è stato identificato l'enzima indoloamina 2,3 diossigenasi (IDO), responsabile del catabolismo del triptofano e della produzione di cataboliti tossici quali la kinineurina [41]. Altra molecola per la quale è stato proposto un possibile ruolo nell'attività immunoregulatoria delle MSC è la prostaglandina E₂ (PGE₂), un derivato dell'acido arachidonico prodotto dall'enzima ciclossigenasi 2 (COX-2), tuttavia, esistono in letteratura dati contrastanti sul ruolo di questa molecola nell'immunomodulazione: nel caso dei linfociti T è stata ipotizzata una funzione pro-apoptotica per timociti immaturi e per linfociti maturi ma quiescenti, mentre nel caso dei linfociti T attivati l'apoptosi viene inibita. I diversi effetti della PGE₂ osservati sperimentalmente potrebbero essere dovuti all'attivazione di diversi pathways di segnalazione intracitoplasmatica [42]. Oltre a quelle già citate, in letteratura sono riportate altre molecole solubili coinvolte nell'immunosoppressione tra cui TGF β -1 (transforming growth factor), HGF (hepatocyte growth factor) e IL-10 (interleuchina 10) [43]. Anche l'INF- γ sembra avere un ruolo centrale nell'immunosoppressione operata dalle MSCs nei confronti di linfociti T, cellule NK e cellule dendritiche. L'INF- γ secreto dai suddetti citotipi, è capace, legandosi al suo recettore sulle MSCs (CD119), di indurre un potenziamento dell'attività IDO, nonché un aumento della secrezione dei suddetti fattori solubili, con incremento dell'immunosoppressione e conseguente riduzione della proliferazione linfocitaria [44].

Recentemente è stato dimostrato che anche il signaling dei Toll-like receptor (TLR) regola le proprietà immunomodulatorie delle MSC inducendone un fenotipo pro-infiammatorio [45]. Le cellule MSCs derivate dal midollo osseo umano esprimono elevati livelli dei recettori TLR 3 e 4, la cui attivazione blocca l'attività immunosoppressiva di

tali cellule, senza influenzare il loro immunofenotipo o il loro potenziale differenziativo, ripristinando, così, un'efficiente risposta delle cellule T nel corso di infezioni pericolose [46]. In particolare la riduzione dell'immunosoppressione delle MSCs in risposta all'attivazione dei TLR 3 e 4 sembra mediata dalla riduzione dell'espressione della molecola Jagged-1 (ligando del recettore Notch) sulla superficie delle MSCs, tale molecola avrebbe infatti una funzione inibitrice sulla proliferazione dei linfociti T che costitutivamente esprimono recettori di tipo Notch [46].

Se il meccanismo di immunomodulazione nei confronti dei linfociti T, cellule dendritiche, cellule NK, è stato ben delineato ed è universalmente accettato, per quanto riguarda i linfociti B ci sono ancora risultati discordanti. Alcuni studi evidenziano infatti che essi non solo non subiscono un blocco proliferativo in presenza di MSCs, ma che anzi la co-cultura con le MSCs stimola la loro proliferazione e differenziazione, nonché la produzione di anticorpi [44]. Altri studi, invece, evidenziano che le cellule MSCs inibiscono la proliferazione dei linfociti B, la loro differenziazione e la produzione di anticorpi [47]. La discordanza tra tali lavori può essere spiegata, almeno in parte, dall'osservazione che con l'aggiunta *in vitro* di IFN- γ esogeno, in quei modelli in cui veniva riportato un effetto trofico delle MSCs sui linfociti B non si osserva più la proliferazione linfocitaria ma, come per i linfociti T, si assiste all'immunosoppressione da parte delle MSCs [44].

Da sottolineare il fatto che non sono solo le MSCs derivate da midollo osseo ad avere funzioni immunoregatorie, è stato infatti dimostrato che anche MSCs presenti in altri distretti sono in grado di sopprimere la risposta immunitaria.

2.3 I tumori

Un tumore si può definire come una crescita afinalistica di tessuto che tende ad essere atipica, autonoma ed aggressiva. I tumori vengono distinti in benigni e maligni. Nei tumori benigni le cellule in genere non presentano disregolazioni di crescita e sono ben differenziate; questi tumori crescono localmente e di solito sono incapsulati in un tessuto fibroso. Diversamente, nei tumori maligni (denominati anche cancro) le cellule insieme con la perdita di regolazione della crescita non raggiungono uno stato altamente differenziato, questi tumori non hanno una crescita confinata al luogo di origine, possono invadere il tessuto adiacente e possono distaccarsi dal tumore primitivo e muoversi fino a

raggiungere altre parti del corpo e lì crescere come masse separate del tumore (metastatizzazione).

In generale, i tumori originano da una o poche cellule normali che vanno incontro a trasformazione maligna. Sebbene i tumori derivino da tessuti self il processo di trasformazione maligna può accompagnarsi all'espressione di molecole riconosciute come estranee dal sistema immunitario. Queste molecole dette antigeni tumorali possono indurre una risposta immunitaria verso le cellule tumorali che le esprimono [2].

L'insorgenza di un tumore deriva perciò da una profonda alterazione dei meccanismi che regolano la proliferazione e l'omeostasi cellulare e dal fallimento dell'ospite nel produrre un'adeguata risposta immunologica antitumorale [48].

2.3.1 Le neoplasie ed il sistema immunitario

Negli anni '50-'60 Burnet e Thomas introdussero il concetto di immunosorveglianza; questa è stata descritta come una funzione fisiologica del sistema immunitario adattivo che permette di riconoscere ed uccidere cellule trasformate prima che esse diano luogo al tumore, o che permette di distruggere il tumore una volta che questo si sia formato. Una serie di osservazioni cliniche, patologiche e sperimentali suggerisce che i tumori possono stimolare la risposta immune dell'ospite. La frequente osservazione istologica della presenza, all'interno o alla periferia delle masse tumorali, di infiltrati di cellule mononucleate, costituiti da linfociti T, cellule NK e macrofagi, sembra suggerire che i tumori possono essere effettivi immunogeni [49]. Il frequente riscontro di una proliferazione linfocitaria a livello dei linfonodi drenanti i distretti sede della neoplasia costituisce un altro segno della capacità dei tumori di stimolare la risposta immune. Inoltre evidenze cliniche sperimentali hanno dimostrato che individui immunocompromessi hanno un maggiore rischio di sviluppare alcuni tipi di tumore rispetto ai soggetti normali indicando che il sistema immunitario protegge dallo sviluppo dei tumori [50]. Osservazioni sperimentali dimostrano che il trapianto di un tumore può essere rigettato da un animale precedentemente immunizzato con quello stesso tumore; l'immunità al trapianto del tumore può essere trasferita dai linfociti di un animale che ha il tumore [51]. Il rigetto del tumore trapiantato presenta le stesse caratteristiche fondamentali delle risposte immuni adattive, ossia la specificità, la memoria ed il fatto di dipendere dai linfociti.

Successivamente venne messa in dubbio la teoria dell'immunosorveglianza mediata dai linfociti T, a favore della teoria che l'immunità innata, attraverso l'attività citotossica dei macrofagi e delle cellule NK, fosse la vera responsabile dell'eliminazione delle cellule tumorali [52].

Studi recenti e rigorosi hanno permesso di riformulare l'ipotesi dell'immunosorveglianza in modo più completo e articolato, fino a giungere alla teoria chiamata "*cancer immunoediting*", che illustra il ruolo del sistema immunitario nello sviluppo dei tumori, in tre distinte fasi chiamate: eliminazione, equilibrio, evasione [53].

La fase di eliminazione, nella quale il sistema immunitario riconosce ed elimina le cellule neoplastiche in corso di trasformazione, corrisponde al processo descritto dall'iniziale teoria della immunosorveglianza. Le cellule tumorali possono essere eliminate in toto (guarigione) o solo in parte; in questo secondo caso si raggiunge uno stato di equilibrio fra proliferazione tumorale e sorveglianza da parte del sistema immunitario, che permette alle cellule neoplastiche di sopravvivere, accumulare ulteriori alterazioni a livello del DNA e modulare l'espressione di antigeni tumorali. La pressione esercitata dal sistema immunitario sul tumore nella fase di equilibrio è sufficiente a controllare la progressione della malattia, ma permette, al contempo, una selezione di cellule neoplastiche capaci di sopravvivere alla risposta immunitaria; queste cellule portano all'ultima fase (evasione), in cui il sistema immunitario non riesce più a controllare la crescita del tumore e la diffusione delle metastasi.

Questo nuovo concetto di "cancer immunoediting" permette un'interpretazione soddisfacente dei dati clinici e sperimentali, che evidenziano un ruolo importante del sistema immunitario nella difesa contro i tumori.

Secondo questa nuova teoria, la risposta antitumorale avviene ad opera di componenti dell'immunità innata e specifica.

- Componenti innate

- Cellule: cellule NK, macrofagi, granulociti
- Fattori solubili: fattori del complemento, proteine C-reattive, proteine leganti il mannosio, proteine amiloidi del siero.

- Componenti adattive

- Cellule: CD4+T α/β (Th), CD8+ T α/β (CTL), CD4+CD8-T γ/δ

Nel 2000 Hanahan e Weinberg [54] hanno definito le sei caratteristiche fondamentali dei tumori: produzione autosufficiente di segnali di crescita, insensibilità ai segnali che

inibiscono la crescita, capacità di resistere all'apoptosi, capacità di indurre l'angiogenesi, perdita dell'inibizione da contatto della crescita, capacità di invadere i tessuti circostanti e di dare metastasi negli organi distanti. Recentemente è stata definita come settima caratteristica fondamentale per lo sviluppo dei tumori la capacità di inibire la risposta del sistema immunitario [53 e 55].

Sono sempre più numerosi gli studi che indagano i complessi meccanismi attraverso i quali si verifica l'evasione del tumore dal controllo del sistema immunitario [56]. Molti fattori del microambiente tumorale contribuiscono all'evasione, come ad esempio: attivazione di cellule T in assenza di un'appropriata co-stimolazione con conseguente anergia o apoptosi delle cellule T stesse [57]; espressione di molecole inibitorie, come B7-H1, HLA-G, HLA-E, sulle cellule T e sulle cellule dendritiche [58 e 59]; mutazione, perdita o riduzione dell'espressione di antigeni tumorali; alterazione dell'espressione delle molecole MHC o delle molecole co-stimolatorie [60]; produzione da parte del tumore di fattori immunosoppressivi solubili, come TGF- β , VEGF, IL-10 e ganglioside [61 e 62]; resistenza ai meccanismi di citotossicità come osservato in tumori con mutazioni dei geni che codificano per FAS, recettore TRAIL [63 e 64]; espansione della popolazione di cellule mieloidi immunosoppressive [65]; induzione di cellule T regolatorie che sopprimono la risposta immunitaria contro le cellule trasformate [66]; espressione nel tumore dell'enzima indolamina 2,3-diossigenasi (IDO) che catabolizza l'aminoacido essenziale triptofano [67], ecc.

Recentemente alcuni lavori presenti in letteratura riportano la presenza di cellule staminali mesenchimali a livello dello stroma tumorale, ipotizzando che tali cellule, grazie alla loro attività immunosoppressiva, promuovano la crescita tumorale invasiva e anche le metastasi a distanza.

2.3.2 Le neoplasie e le cellule staminali mesenchimali

Le MSCs sono, oltre ad altre cellule presenti nel microambiente tumorale, sempre più identificate come un'importante popolazione di cellule che modula la progressione tumorale e la sensibilità ai farmaci. L'ampiamente descritta funzione fisiologica delle MSCs nella soppressione immunitaria è stata anche collegata con la progressione tumorale. È stato dimostrato, ad esempio, che in co-culture di MSCs, cellule del cancro al seno e PBMNC, le MSCs erano capaci di spostare l'equilibrio tra citochine Th1/Th2 in favore delle citochine Th2 permettendo così alle cellule del cancro alla mammella di evadere il sistema immunitario [68].

Le MSCs sono capaci di migrare al tessuto danneggiato e, dato che il microambiente tumorale ricorda strettamente il tessuto danneggiato, le MSCs possono migrare ai tumori in via di sviluppo (attraverso SDF-1 α /CCCR4, CXCL8 e MMP-2) e promuoverne la crescita stimolando proliferazione, angiogenesi ed inibendo l'apoptosi. Tali cellule riescono a stimolare la crescita o attraverso la secrezione paracrina di fattori angiogenetici e anti-apoptotici o differenziando in miofibroblasti associati al tumore, che possono incrementare la crescita tumorale, la formazione di metastasi e la resistenza alla terapia [69-71]. Dimostrazioni del coinvolgimento delle MSCs nel promuovere le metastasi si sono ottenute da esperimenti in cui le cellule del cancro alla mammella erano messe insieme alle MSCs e successivamente iniettate nel topo. Unire le cellule tumorali con le MSCs aumentava il loro potenziale di metastatizzare ad organi distanti rispetto a quando il topo era iniettato con le sole cellule tumorali. Ulteriori esperimenti hanno messo in evidenza che le cellule tumorali inducono l'espressione di CCL5 nelle MSCs che, a sua volta, aumenta la motilità e l'invasione delle cellule cancerose [72].

In contrasto, in letteratura ci sono anche lavori in cui viene dimostrato che le MSCs inibiscono la crescita tumorale (ad es. nelle leucemia e nell'epatoma) [73 e 74]. Questi effetti anti-tumorali coinvolgono la down regolazione di Akt, beta-catenina, Bcl-2 e c-Myc, portando ad una ridotta proliferazione, arresto in G1, soppressione degli oncogeni ed incremento dell'apoptosi.

Queste differenze sull'effetto pro-tumorale o anti-tumorale delle MSCs può in parte essere spiegato dal tipo di tumore studiato, dai metodi di purificazione usati per ottenere le MSCs e dal numero di MSCs usato.

Le MSCs sono quindi cellule pluripotenti, che, una volta arrivate nel microambiente tumorale, possono secernere una varietà di fattori che possono influenzare positivamente o negativamente la crescita del tumore.

Recentemente sta emergendo che le MSCs hanno anche un ruolo fondamentale nella resistenza ai trattamenti anti-tumorali. Nella leucemia mieloide cronica (CML), ad esempio, le cellule possono essere protette dalla morte cellulare indotta da Imatinib qualora vengano co-coltivate con le MSCs. Questo meccanismo protettivo avviene attraverso la secrezione di SDF-1 α da parte delle MSCs .

La resistenza ai farmaci anti-cancro non avviene solo nelle neoplasie ematologiche; le MSCs infatti sono state anche implicate nella resistenza alla chemioterapia nei tumori

solidi. Linee cellulari del carcinoma testa collo a cellule squamose (FaDu e HLaC 78) sono più resistenti al trattamento con il Paclitaxel quando co-coltivate con MSCs. L'uso di sistemi trans-well indica che i fattori che danno la chemio-resistenza sono secreti dalle MSCs e non è necessario il contatto cellulare [75].

Un altro meccanismo mediante il quale le MSCs possono conferire resistenza alla chemioterapia è mediante la loro conversione a cellule inizianti il cancro o a cellula staminale tumorale. La cellula staminale tumorale ha la capacità di iniziare la formazione del tumore e di dare metastasi, inoltre essa è ritenuta essere altamente resistente ai farmaci antitumorali e quindi responsabile di recidive. Di recente è stato dimostrato che la metilazione dei promotori dei due geni soppressori del tumore RasFA e HIC1 nelle MSCs causava la loro trasformazione verso cellule inizianti il tumore e le rendeva capaci di crescere in maniera indipendente dall'attacco alla matrice, formando tumori in topi nudi e mostrando un'aumentata resistenza al trattamento con i chemioterapici [76]. Queste scoperte gettano nuova luce sul ruolo delle MSCs nella formazione del tumore e richiedono ulteriori ricerche per verificare se le MSCs in condizioni fisiologiche, mediante questo meccanismo, possono formare un pool di possibili cellule inizianti il cancro.

Da un punto di vista clinico, dati riguardanti il ruolo delle MSCs nella progressione tumorale sono ancora mancanti. Uno studio condotto nel 2009 mostrava che i pazienti affetti da sarcoma osseo avevano un maggior numero di MSCs circolanti rispetto ai volontari sani [77]. Comunque in questo studio non sono state fatte correlazioni tra il numero di MSCs presenti nel sangue e la prognosi o la risposta alla terapia [77]. L'aumento del numero di MSCs circolanti in pazienti con il cancro indica che la presenza di un tumore sollecita una risposta che porta le MSCs a migrare nel circolo. La presenza delle MSCs nel torrente circolatorio le pone in una posizione dove esse sono facilmente esposte a relativamente alte concentrazioni di farmaci anticancro come chemioterapici, rendendo più probabile che queste cellule possano venire attivate dal farmaco ed avere quindi un significativo ruolo nella risposta alla terapia.

Concludendo quindi, si può dire che una notevole caratteristica del ruolo delle MSCs nella progressione tumorale è la loro ampia versatilità e plasticità. Le MSCs sono implicate nel promuovere quasi tutte le funzioni distintive del cancro incluse l'angiogenesi, le metastasi, l'effetto anti-apoptotico, e l'evasione del sistema immunitario. Tali cellule possono promuovere la crescita tumorale e la farmaco-

resistenza attraverso uno stretto contatto con le cellule tumorali o attraverso un meccanismo sistemico che coinvolge fattori secreti. Le MSCs potrebbero essere quindi usate come bersaglio nelle terapie anticancro per inibire significativamente la crescita tumorale e le metastasi ed incrementare la risposta alla terapia.

Uno dei tumori in cui definire la presenza di MSCs potrebbe essere importante da un punto di vista terapeutico e non solo è il tumore testa-collo a cellule squamose. Questo perché tale tumore è caratterizzato da un massivo infiltrato composto principalmente da cellule T e cellule dendritiche ma anche da B, NK e macrofagi, per cui la presenza in tale contesto di MSCs potrebbe influenzare la risposta immunitaria nei confronti del tumore essendo esse cellule aventi attività immunoregulatoria. Inoltre è un tumore caratterizzato dalla presenza di molti miofibroblasti nello stroma che potrebbero derivare dalle MSCs, ed infine è un tumore resistente ai trattamenti e con un alto tasso di recidive e, come è stato osservato, le MSCs conferiscono chemio-resistenza.

2.4 Tumore testa-collo a cellule squamose (HNSCC)

Il tumore testa-collo a cellule squamose (HNSCC) è uno tra i dieci cancri più comuni a livello mondiale, con la maggior parte dei carcinomi che colpiscono la mucosa del tratto aero-digestivo superiore [78-80].

I maggiori fattori di rischio per questo tipo di tumore sono il tabagismo (il rischio di sviluppare il tumore è 3-4 volte superiore nei fumatori rispetto ai non fumatori), l'alcol e il papilloma virus (HPV).

Inoltre una maggiore incidenza di questo tumore è stata osservata in pazienti con immunodeficienza acquisita o iatrogena, sottolineando l'importante contributo del sistema immunitario nel controllo del HNSCC.

Nonostante i progressi nella comprensione e nel trattamento del HNSCC, il tasso di sopravvivenza non è significativamente aumentato negli ultimi 30 anni, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi pari al 15-50% [78, 81-83]. I trattamenti correnti per HNSCC possono essere traumatici, dolorosi e deturpanti, influenzando drasticamente la qualità della vita. Al momento, il trattamento di HNSCC include la resezione chirurgica e/o la combinazione di chemio e radioterapia [79, 81 e 84]. Nonostante questi trattamenti, la prognosi di HNSCC rimane scarsa a causa di diagnosi tardive, di recidive locali e di comparsa di metastasi ai linfonodi loco regionali [78, 80,

81, 84 e 85]. Per aumentare la capacità diagnostica e l'efficacia del trattamento è necessario quindi capire meglio la patogenesi e le caratteristiche del HNSCC.

2.4.1 MSCs in HNSCC

Lo stroma tumorale comprende la matrice extracellulare (*ECM*) e una popolazione eterogenea di cellule che cooperano tra loro, come miofibroblasti, mastociti, cellule endoteliali, macrofagi associati al tumore e altri leucociti infiltranti il tumore tra cui linfociti T, NK e talvolta granulociti [86]. Tutte le cellule influenzano il processo di carcinogenesi e di progressione tumorale. Il meccanismo con cui le cellule influenzano il loro microambiente è ancora materia di dibattito.

In letteratura ci sono alcuni lavori in cui viene ipotizzato che le cellule MSCs residenti e del midollo osseo migrano a livello tumorale dove costituiscono i precursori dello stroma associato ai HNSCC, promuovendo la crescita tumorale invasiva e anche le metastasi a distanza [87].

2.4.2 Reclutamento delle MSCs a livello di HNSCC

Le citochine ed i fattori di crescita secreti dal tumore sono in grado di reclutare cellule residenti e locali come le MSCs [88 e 89]. L'alterata espressione di citochine e fattori di crescita ha un ruolo importante nella trasformazione maligna di molti cancro incluso HNSCC. Una diminuzione dei livelli di citochine nel siero è associata con la risposta alla terapia mentre un incremento è associato alla progressione e alle recidive dei HNSCC [87]. Una maggior espressione di TNF- α (tumor necrosis factor), di VEGF (vascular endothelial growth factor), di HGF (hepatocyte growth factor), di PDGF-AB (platelet derived growth factor), di TGF- β e di interleuchine è stata osservata nei campioni tumorali e nel siero dei pazienti con tumore HNSCC. Tra queste, PDGF-AB, VEGF, HGF e IL-8 esercitano un forte effetto chemiotattico sulle cellule MSCs di midollo osseo e sono presumibilmente coinvolte nel reclutamento delle MSCs nel tumore [90]. La stimolazione di cellule MSCs con citochine pro-infiammatorie come il TNF- α aumenta, *in vitro*, la migrazione delle MSCs suggerendo che la mobilitazione e il seguente homing verso il tumore dipende dallo stato infiammatorio locale e sistemico [90]. Inoltre, le citochine infiammatorie stimolano l'attività di specifiche metallo-proteasi della matrice (*MMP*) nelle MSCs, consentendo loro di extravasare e migrare all'interno del tessuto [91].

Il reclutamento delle MSCs è anche influenzato dai trattamenti per il cancro. I tumori irradiati, rispetto a quelli non irradiati, mostrano un incremento nel reclutamento delle MSCs. La migrazione delle MSCs ai tumori irradiati potrebbe avvenire mediante un meccanismo in cui le cellule tumorali secernono citochine in risposta alla radiazione, portando ad up-regolare i recettori delle chemochine sulle MSCs, con successiva migrazione verso il tumore che esprime i ligandi delle chemochine. La conseguente produzione di fattori solubili da parte delle MSCs potrebbe contribuire alla crescita tumorale e alle metastasi.

2.4.3 MSCs e progressione HNSCC

Modelli *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato che le MSCs stimolano la crescita invasiva dei tumori solidi ed ematologici [92]. Le interazioni stroma-tumore sono importanti nella patogenesi di HNSCC.

Si ritiene che le MSCs possano essere coinvolte nella progressione di HNSCC mediante: l'induzione della linfo\angiogenesi, la modulazione del sistema immunitario e la generazione di miofibroblasti associati al tumore [87].

MSCs e linfo\angiogenesi

L'angiogenesi e la linfogenesi sono responsabili della diffusione metastatica delle cellule cancerose.

L'angiogenesi è controllata sia da fattori angiogenici direttamente prodotti dalle cellule tumorali che da fattori prodotti dai tessuti stromali circostanti il tumore. VEGF e IL-8 sono fattori pro-angiogenici up-regolati in vari tumori solidi, compresi i tumori HNSCC e sono associati alla crescita tumorale invasiva e alla diminuzione della sopravvivenza [93]. Le MSCs possono agire come precursori di cellule endoteliali e di periciti e promuovere l'angiogenesi [94]. MSCs trattate con VEGF acquisiscono un fenotipo endoteliale ed esprimono marcatori tipici delle cellule endoteliali, come il VEGFR1, VEGFR2, VE (vascular endothelial)-caderina, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) e vWF (von Willebrand Factor) [95]. I fattori paracrini secreti dalle MSCs reclutano cellule endoteliali e muscolari lisce e stimolano la loro proliferazione [96]. Inoltre, l'ipossia, tipica del tumore, è un forte stimolo per la vascolarizzazione; essa infatti incrementa la secrezione, da parte delle MSCs, dei fattori pro-angiogenici VEGF-A, FGF-2 (fibroblast growth factor), FGF-7, IL1, IL6, PDGF, TGF β , TNF α [96].

Il coinvolgimento dei linfonodi regionali è un importante indicatore dell'aggressività tumorale ed è un fattore prognostico per i pazienti con HNSCC. L'aumento della linfogenesi tumorale, invece, correla con le metastasi linfonodali nei HNSCC [97]. VEGF-C e VEGF-D sono coinvolte nella linfogenesi e nella metastasi linfonodale [98]. Esiste una correlazione diretta fra l'espressione di VEGF-C e la presenza di metastasi linfonodali nei HNSCC [97 e 99]. Nei pazienti con carcinoma alla lingua, VEGF-C associa con le dimensioni del tumore primario, le metastasi ai linfonodi regionali, le metastasi a distanza e la prognosi. Le MSCs hanno un ruolo importante nella linfogenesi e nell'acquisizione di un fenotipo linfatico quando esposte a VEGF-C [100]. La migrazione delle MSCs verso il VEGF-C in modelli *in vitro* suggerisce che tale fattore può reclutare MSCs circolanti [101].

MSCs e modulazione del sistema immunitario

HNSCC ha sviluppato varie strategie per evadere la risposta immunitaria antitumorale [102]. HNSCC sono infiltrati principalmente da cellule T e cellule dendritiche, ma anche da cellule B, NK, macrofagi e granulociti eosinofili. Negli HNSCC è stato osservato che la funzione dei linfociti T e delle cellule dendritiche è compromessa; viene ipotizzato che anche le MSCs possano esercitare degli effetti immunoregolatori in tale contesto, creando un ambiente immunosoppressivo a livello del tumore [101]. Le MSCs, infatti, come già descritto nei precedenti paragrafi, influenzano la proliferazione e le funzioni delle cellule immunitarie (cellule T, DC, NK, B, e macrofagi).

MSCs come fonte di miofibroblasti associati al tumore.

I miofibroblasti sono abbondantemente presenti nello stroma dei tumori in via di sviluppo e guidano la crescita tumorale invasiva fornendo un ambiente favorevole. Ci sono molte evidenze sull'attività di crescita pro-invasiva dei miofibroblasti associati al tumore, mentre non ci sono dati che suggeriscono un differente comportamento dei miofibroblasti tra HNSCC e altri tipi di tumore. I miofibroblasti sono cellule fusiformi con nuclei frastagliati con capacità contrattile. La caratterizzazione dei miofibroblasti stromali è basata su una combinazione di markers per i quali sono positivi così come α -SMA, γ -SMA, desmina e vimentina e di markers per i quali sono negativi così come CD31, CD34 e citocheratina. I miofibroblasti producono componenti ed enzimi di rimodellamento della matrice extracellulare, fattori di crescita, citochine e chemochine che nel complesso creano un ambiente che promuove la crescita invasiva del tumore [103].

L'analisi immunoistochimica di α -SMA ha evidenziato che i miofibroblasti sono abbondantemente presenti nel tumore HNSCC. Tale presenza è associata ad importanti caratteristiche clinico-patologiche del tumore HNSCC che comprendono le metastasi linfonodali, lo stadio della malattia e le recidive regionali [104]. Si ritiene che i miofibroblasti presenti nello stroma dei vari tumori solidi e di HNSCC derivino dalle MSCs. La differenziazione in miofibroblasti è regolata da fattori di crescita, principalmente della famiglia del TGF- β , che sono secreti abbondantemente dal tumore HNSCC.

Vari fattori paracrini prodotti dalle MSCs potrebbero essere implicati nella progressione del tumore HNSCC [87]. Ad esempio, SDF-1 α promuove la crescita invasiva del tumore HNSCC grazie all'attivazione di NF-kB (*Nuclear-Factor-KB*) [105]; la quale, secondo studi di profili d'espressione genica, è indice di rischio elevato per la progressione del tumore HNSCC [106]. Un altro esempio è rappresentato dal recettore tyrosine Kinasi c-Met che stimola la crescita invasiva e le metastasi.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Pazienti

Tredici pazienti affetti da carcinoma testa collo a cellule squamose (HNSCC) (confermato da biopsie) sono stati arruolati tra dicembre 2010 e maggio 2012 con il consenso dell'ospedale universitario di Firenze. Tutti i partecipanti hanno firmato un consenso informato e le procedure seguite nello studio sono state approvate dal comitato etico della Azienda Ospedaliero-Universitaria di Careggi (AOUC). Il sito e lo stadio del tumore sono stati classificati in accordo alla classificazione TNM AJCC, 2010 (Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. 2010, 2010, X, 646 p. 130). Il volume del tumore primario è stato calcolato sulla base di immagini diagnostiche. I campioni tumorali e normali sono stati ottenuti in anestesia generale durante la procedura chirurgica, sotto condizioni sterili; i campioni di sangue periferico sono stati prelevati quando il paziente arrivava in sala operatoria. I criteri di inclusione per l'arruolamento dei pazienti nello studio erano: 1) pazienti con HNSCC (confermato da biopsie), 2) pazienti affetti da tumore testa-collo primario non trattati precedentemente, 3) pazienti che non hanno mai avuto tumore, 4) assenza di metastasi sistemiche. Una descrizione dei pazienti è riassunta in tabella 1.

Il follow-up ambulatoriale dei pazienti include un esame clinico mensile durante il primo anno dopo l'intervento chirurgico e ogni due mesi durante il secondo anno dall'intervento.

Un controllo mediante tomografia computerizzata (TAC) è stato effettuato ad un mese dall'intervento e altre due volte nell'anno successivo ad esso e/o dopo trattamento con radioterapia, in accordo con i criteri etici del Comitato Regionale sulla Sperimentazione Umana.

3.2 Reagenti ed anticorpi

Il medium usato per le colture delle cellule linfocitarie è l'RPMI 1640 (Seromed, Berlino) addizionato con glutamina 2mM, amminoacidi non essenziali all'1%, acido piruvico all'1%, β -mercaptoetanololo $2 \cdot 10^{-5}$ M (acquistati tutti da Invitrogen) e siero bovino fetale al 10% (HyClone, Logan, UT, USA). Il terreno di coltura utilizzato per le cellule mesenchimali è il DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) high glucose (HG) (acquistato presso Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA), addizionato con

NaHCO₃ (44mM, Gruppo Montedison, Farmitalia, Carlo Erba\ Div.Analitica, Milano, Italy), sodio piruvato (2mM), penicillina (0,1 U/ml), streptomycin (0,1 mg/ml) e siero bovino fetale al 15%. Il sodio piruvato e la penicillina/streptomycin sono stati acquistati presso Sigma Aldrich, (St.Louis, USA). La tripsina/EDTA utilizzata per staccare le cellule aderenti è stata acquistata presso Lonza Group Ltd (Switzerland). Gli anticorpi monoclonali utilizzati per l'analisi citofluorimetrica sono stati acquistati tutti da BD Biosciences (San Diego, CA, USA) ad eccezione degli anticorpi anti-CD29, anti-CD105 (o Endoglin) che sono stati acquistati presso Ancell Corporation, (Bayport, MN, USA) e dell'anticorpo anti-CD106 (V-CAM-1, mouse IgG1_k) acquistato da Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA). Per il differenziamento adipogenico ed osteogenico sono stati utilizzati Oil Red O, Alizarin Red S, Insulina, IBMX (*3-isobutil-1-metilxantina*), e Desametasone acquistati presso Sigma Aldrich, (St.Louis, USA). La stratificazione su gradiente di densità è stata fatta su FicollLymphoprepTM di NycomedPharm (Oslo, Norway, EU). Per la purificazione dei linfociti T CD4+ dai campioni di sangue periferico è stato utilizzato CD4 Isolation Kit II Miltenyi Biotec (Bisley, Germany, EU). Per la separazione immunomagnetica è stato utilizzato magnete di tipo VarioMACS con colonne CS (Miltenyi Biotec, Germania).

3.3 Purificazione e coltura delle cellule mesenchimali stromali ottenute dai campioni di biopsia tumorale

I campioni ottenuti dalle biopsie tumorali sono stati prima sottoposti a digestione enzimatica mediante incubazione in presenza di collagenasi di tipo IV (750 U/ml, Sigma Aldrich) poi sottoposti al sistema "Medi Machine" (Becton Dickinson). La sospensione monocellulare così ottenuta è stata sia sottoposta ad analisi immunofenotipica tramite metodica citofluorimetrica sia messa in coltura in fiasche di plastica in DMEM addizionato di FCS al 15% al fine di selezionare le cellule stromali mesenchimali. Le colture sono state incubate a 37°C in un'atmosfera al 5% CO₂. Dopo 72 ore di coltura le cellule non aderenti sono state rimosse. Quando le cellule aderenti raggiungevano una confluenza intorno al 70-80% , venivano staccate mediante l'utilizzo di Tripsina/EDTA solution (0,25 mg/ml a 37°C per 5 minuti), raccolte ed espanse in fiasche più ampie. Normalmente una popolazione omogenea di cellule si ottiene dopo circa 3 settimane di coltura.

3.4 Purificazione e coltura delle cellule staminali mesenchimali di midollo osseo

Le MSCs, utilizzate come controllo positivo, sono state generate da campioni di midollo osseo di donatori sani, che hanno dato consenso informato.

Le cellule di midollo osseo sono state coltivate in fiasche FalconTM da 25 cm² di Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA) ad una concentrazione di $30 \cdot 10^6$ cellule nucleate in 5 ml di DMEM/HG, con aggiunta di GLUTAMAX^{JT}TM, FCS al 15%, penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml). Le colture sono state incubate a 37°C in un'atmosfera al 5% CO₂. Dopo 72 ore le cellule non aderenti sono state rimosse dalle fiasche di coltura mediante lavaggio con PBS pH 7.2. Le cellule aderenti sono state coltivate in nuovo terreno di coltura fino al raggiungimento della confluenza cellulare. Raggiunta la confluenza al 70-80%, le cellule aderenti sono state staccate mediante l'utilizzo di tripsina (0,05% di tripsina a 37°C per 5 minuti), raccolte ed espanse in fiasche più ampie. Normalmente una popolazione omogenea di cellule si ottiene dopo 2 o 3 settimane di coltura. A livello sperimentale sono state impiegate cellule presentanti un pattern immunofenotipico con una percentuale di omogeneità maggiore del 99%.

3.5 Purificazione dei linfociti T CD4⁺

3.5.1 Separazione su gradiente di densità di cellule mononucleate

L'isolamento delle cellule mononucleate dalle restanti componenti cellulari del sangue è stato effettuato tramite una separazione su gradiente di Ficoll (densità pari a 1,007 g/ml), usando un rapporto sangue/Ficoll di 3:2. I campioni stratificati sono stati centrifugati a 1500g/min (rpm) per 20 minuti a 4°C. Successivamente alla centrifugazione viene raccolto l'anello di cellule mononucleate situato all'interfaccia plasma/Ficoll; le cellule vengono lavate per due volte con soluzione fisiologica e centrifugate a 1100 giri/min per 10 minuti per ciascun lavaggio, in modo tale da eliminare gli eventuali residui di Ficoll, che, se presente, risulterebbe tossico per le cellule.

In seguito ai lavaggi le cellule vengono risospese in un volume noto di soluzione fisiologica e contate utilizzando la camera di Neubauer.

3.5.2 Separazione immunomagnetica dei linfociti T CD4⁺

Al fine di ottenere la popolazione T CD4⁺, si effettua la purificazione tramite selezione negativa con CD4 isolation kit II e colonna magnetica CS inserita nell'apparato VARIO

MACS (Miltenyi Biotech). In breve, le cellule mononucleate ottenute tramite la stratificazione su Ficoll, vengono incubate per 15 minuti a 4°C con il cocktail di anticorpi biotinilati presente nel Kit. Tale cocktail contiene i seguenti anticorpi biotinilati: anti-CD8, -CD14, -CD16, -CD19, -CD34, -CD56, -CD123, -TCR $\gamma\delta$ e Glicoforina A. Trascorso il tempo dell'incubazione vengono aggiunti anticorpi anti-biotina coniugati a microbiglie superparamagnetiche. Le cellule vengono incubate per altri 20 minuti a 4°C, e, quindi lavate con PBS pH 7.2+ FCS allo 0,5% e risospese nello stesso buffer. Si procede al passaggio in colonna.

Il principio della metodica consiste nel fatto che gli anticorpi anti-biotina, essendo coniugati a microbiglie superparamagnetiche, sono trattiene insieme alle cellule che legano, all'interno della colonna inserita in un campo magnetico. Quello che ne risulta è una selezione negativa, in quanto le cellule CD4+ non legano le biglie paramagnetiche e possono attraversare la colonna ed essere raccolte in una provetta posta al di sotto di questa.

Per determinare la purezza della popolazione ottenuta con la separazione, viene effettuata un'analisi citofluorimetrica dei marcatori di membrana CD3, CD4 e CD8.

3.6 Analisi citofluorimetrica

3.6.1 Analisi citofluorimetrica su cellule ottenute dai campioni tumorali

Per determinare il fenotipo delle cellule ottenute dai campioni tumorali, al momento del prelievo e dopo tre settimane di coltura, è stata eseguita un'analisi citofluorimetrica multiparametrica. A questo scopo è stata valutata l'espressione delle seguenti molecole di membrana CD105, CD106, CD29, CD73, CD90, CD44, CD45, CD14, HEA, CD31.

Per ogni test un numero compreso tra cento mila e duecento mila cellule è stato lavato a freddo con PBS pH7,2 contenente BSA 0,5% e NaN₃ 0.02% (buffer di lavaggio) e, dopo l'aggiunta di γ -globuline di coniglio (10mg/ml) per saturare i recettori per il frammento costante delle Ig, sono stati aggiunti i vari anticorpi monoclonali specifici coniugati a fluorocromi. Successivamente le cellule sono state incubate in ghiaccio per 15 minuti; al termine dei quali sono state lavate e risospese nel buffer di lavaggio e valutate al citofluorimetro BD-LSRII (Becton Dickinson) analizzando l'acquisizione con software Diva (BD Biosciences).

3.6.2 Analisi citofluorimetrica su cellule T CD4+.

Per stabilire la purezza dei linfociti T CD4+, ottenuti dalla separazione immunomagnetica, si è valutata l'espressione in membrana delle molecole CD3, CD4 e CD8 seguendo la procedura descritta nel paragrafo precedente.

3.7 Saggio di differenziazione delle cellule mesenchimali stromali tumorali

La natura staminale delle cellule mesenchimali stromali del tumore è stata testata valutando la loro capacità di differenziare, *in vitro*, in adipociti ed osteoblasti previa opportuna coltura con medium lineage-specifici. Come standard di riferimento abbiamo utilizzato BM-MSCs ottenute da donatori sani e, come controllo negativo, le BM-MSCs e le stesse cellule mesenchimali stromali del tumore poste nel medium di coltura standard (DMEM+FCS 15%) in assenza di stimoli differenziativi.

Le BM-MSCs e le cellule stromali mesenchimali tumorali sono state staccate con Tripsina\EDTA solution, messe in piastre da 6 well ad una concentrazione di 150×10^3 /well, incubate a 37°C in un'atmosfera al 5% CO₂ e lasciate aderire per 24 ore prima dell'inizio dell'induzione. La differenziazione adipogenica è stata ottenuta coltivando le cellule per 21 giorni in presenza di medium adipogenico contenente DMEM + 10% FCS, dexametasone (1µM), insulina (10µg/ml) e 3-isobutyl-1- Methylxantina (0.5 µM) e indometacina (100 µM). La differenziazione osteogenica è stata ottenuta coltivando le cellule per 21 giorni in presenza di medium osteoblastico contenente dexametasone 10^{-7} M, acido ascorbico (50µg/ml), β-glicerofosfato (10mM) e NaH₂PO₄ (1mM). La dimostrazione del differenziamento è stata eseguita mediante colorazione specifica sulle cellule e valutazione in real-time quantitative RT-PCR dell'espressione dei geni target.

3.7.1 Colorazione adipogenica ed osteogenica

Entrambe le colorazioni sono state eseguite al momento dell'induzione del differenziamento e dopo 21 giorni da esso, sia sulle cellule poste nei medium differenziativi che sui controlli negativi, seguendo le istruzioni riportate sul protocollo del fornitore.

Per la colorazione adipogenica è stato usato come colorante l' Oil Red O che colora in rosso i vacuoli lipidici, per quella osteogenica l'Alizarin Red che colora in rosso i depositi di calcio.

3.8 Real-time quantitative RT-PCR

È stata eseguita un'analisi molecolare sulle cellule tumorali dei pazienti e sui controlli positivi e negativi, al momento dell'induzione del differenziamento, dopo una settimana e dopo 21 giorni.

L'mRNA totale è stato estratto dalle cellule usando l'RNeasy Microkit (Quiagen, Hilden, Germany) e poi è stato trattato con la DNAsi I (Quiagen) per eliminare possibili contaminazioni di DNA genomico. La resa dell'estrazione è stata valutata allo spettrofotometro (Nanodrop) che consente di valutare sia la quantità di RNA che la purezza, quest'ultima intesa come contenuto di proteine e DNA rimasti.

Successivamente l'mRNA estratto è stato retrotrascritto in cDNA usando TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguendo il protocollo del fornitore.

La TaqMan RT-PCR è stata eseguita utilizzando ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystem) seguendo le istruzioni del fornitore.

Tutte le amplificazioni sono state eseguite su MicroAmp optical 96-well reaction plate con TaqMan[®] Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems) ed usando Kit Assay on Demand (Applied Biosystems). In particolare, le sonde utilizzate sono, per lineage adipogenico, PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma), FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4) e ACDC (Adiponectina), e, per il lineage osteogenico, RUNX2 (Run-related transcription factor 2), ALP (fosfatasi alcalina), BGLAP (Osteocalcina) e M1 (Osteopontina).

La valutazione dell'mRNA è stata realizzata basandosi sul numero di cellule analizzate mentre i risultati sono stati normalizzati sulla base dell'espressione del gene di controllo GAPDH.

3.9 Test di proliferazione dei linfociti T CD4+

Al fine di poter valutare un possibile effetto delle cellule mesenchimali stromali tumorali sulla proliferazione dei linfociti T CD4⁺ eterologhi attivati, è stato eseguito un test di proliferazione su co-culture di cellule T e cellule mesenchimali stromali dei pazienti affetti da HNSCC, utilizzando come controllo positivo le co-culture di BM-MSCs e linfociti T. Le BM-MSCs e le cellule mesenchimali stromali tumorali sono state staccate con Tripsina\EDTA solution e seminate in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, con una concentrazione decrescente che va da 20×10^3 a 100 cellule/pozzetto ed incubate a 37°C in

un'atmosfera al 5% CO₂ over night al fine di permettere alle cellule di aderire. Il giorno successivo, in coltura con le BM-MSCs e con le cellule mesenchimali stromali tumorali e da soli, sono stati posti i linfociti T CD4⁺ ad una concentrazione di 10⁵/pozzetto in RPMI + 10% FCS. Il test è stato svolto in presenza o in assenza dello stimolo proliferativo policlonale rappresentato dagli mAb agonisti anti-CD3 (HIT3a) e anti-CD28 (CD28.2), entrambi usati ad una concentrazione di 5 µg/ml. Al 4° giorno di coltura è stata aggiunta timidina triziata (³H-TdR) alla dose di 0.5 µCi/pozzetto. Dopo 8h di incubazione è stato valutato l'accumulo intracellulare del radionuclide mediante β-counter Betaplate 1205 di Wallac/Perkin Elmer (Downers Grove, IL, USA).

Gli esperimenti descritti sopra, basati sulle co-culture delle cellule T e MSCs sono stati ripetuti, in presenza o in assenza di varie concentrazioni (1000 µM, 500 µM, 250 µM) dell'inibitore methyl-tryptophano.

3.10 Analisi statistica

Il t test di Student è stato utilizzato per valutare le differenze nella frequenza delle MSCs tra i tessuti sani e tumorali (figura 1), tra l'espressione di markers cellulari adipocitari o osteocitari in MSCs tumorali indifferenziate e differenziate in-vitro (figura 3) e tra la proliferazione cellulare di cellule T stimulate policlionalmente in assenza o in presenza di tumor-MSCs (o BM-MSCs come condizione di controllo, figura 4 pannello A e B).

La correlazione tra la frequenza di cellule CD90⁺ ed il volume del tumore, e tra le cellule CD90⁺ e le cellule CD45⁺ o CD31⁺ è stata valutata sulla base di R² ed il numero di pazienti (figura 5). P<0.05 (due code) è considerata statisticamente significativa.

4. RISULTATI

4.1 Caratterizzazione immunofenotipica dei campioni ottenuti da biopsie tumorali di pazienti affetti da HNSCC

Per prima cosa abbiamo valutato la proporzione di cellule appartenenti a differenti lineages cellulari a livello di HNSCC o tessuto sano derivati dal tratto aero-digestivo superiore. In particolare, abbiamo derivato una sospensione cellulare da campioni tumorali ottenuti da 13 differenti pazienti affetti da HNSCC. Da 6 dei 13 pazienti è stato possibile ottenere anche campioni di controllo (tessuto normale) presi dal lato contro laterale rispetto al tumore. La sospensione cellulare è stata valutata mediante citofluorimetria in modo da stabilire la frequenza cellulare degli elementi epiteliali (cellule HEA+), cellule di origine stromale (cellule CD90+), endotelioцити (cellule CD31+) e leucociti (cellule CD45+). Detriti e cellule morte sono state escluse dall'analisi sia sulla base dei parametri fisici sia sulla marcatura con propidio.

Come mostrato in figura 1, la frequenza delle cellule CD90+ risultava significativamente più alta nei campioni tumorali rispetto a quelli di controllo, essendo la proporzione $10.71 \pm 2.3\%$ SE vs $2.2 \pm 0.5\%$ SE rispettivamente ($p=0.014$). Mentre non sono state osservate differenze significative tra tessuto tumorale e sano per gli altri marker cellulari.

4.2 Le cellule stromali aderenti derivate *in vitro* da HNSCC condividono proprietà fenotipiche e staminali con le cellule staminali mesenchimali di midollo osseo ottenute da pazienti sani

Da 9 dei 13 pazienti abbiamo ottenuto un numero sufficiente di cellule da permetterci di coltivarle in fiasche di plastica, allo scopo di ottenere cellule stromali aderenti in accordo alle procedure raccomandate dalla Società Internazionale per la Terapia Cellulare (2005) per l'isolamento delle MSCs. Due colture cellulari delle nove sono state scartate a causa di una contaminazione batterica; le rimanenti 7 colture proliferavano *in vitro* come popolazione omogenea di cellule aderenti ricordando la morfologia delle BM-MSCs. Dopo tre settimane di coltura (p3-p4), le cellule sono state valutate

mediante citofluorimetria per l'espressione di markers tipici delle BM-MSCs, quali CD44, CD105, CD73, CD90, CD29, CD31, CD45, CD14, CD34. Inoltre, per escludere la presenza di cellule epiteliali, presenti nella sospensione cellulare di partenza, queste cellule sono state analizzate anche per la positività all'antigene umano epiteliale (HEA). Come mostrato in figura 2, le cellule stromali aderenti ottenute dal campione tumorale mostravano lo stesso fenotipo delle BM-MSCs (ottenute da tre differenti donatori sani) utilizzate come controllo. Per escludere ulteriormente la presenza di elementi epiteliali, abbiamo valutato mediante real time quantitativa RT-PCR, tutte le colture cellulari per l'espressione di mRNA per citocheratina che è risultata assente in tutti i campioni.

Allo scopo di studiare il potenziale differenziativo delle cellule tumorali stromali aderenti verso il lineage osteogenico o lipogenico, le cellule sono state coltivate in presenza di un appropriato medium di coltura. In particolare le cellule stromali tumorali aderenti o BM-MSCs, usate come controllo, erano piastrate in presenza di medium adipogenico, osteogenico o normale. Dopo 3 settimane, le cellule aderenti poste nelle condizioni sopra descritte sono state trattate con Oil Red O, per valutare la differenziazione lipogenica, o con Alizarin Red, per valutare la differenziazione osteogenica. Come rappresentato in figura 3, né le BM-MSCs, né le cellule stromali tumorali aderenti, acquisivano una colorazione positiva quando coltivate nel normale medium di coltura, mentre entrambi i tipi cellulari acquisivano una colorazione positiva con Oil Red O, quando coltivate in medium adipogenico, o con Alizarin Red quando coltivate nel medium osteogenico.

Per confermare ulteriormente questi dati, è stato valutato, a differenti tempi della coltura cellulare, l'mRNA relativo a quei markers altamente espressi durante la differenziazione adipogenica o osteogenica mediante real time quantitativa RT-PCR. Per quanto concerne la differenziazione verso il lineage adipogenico, le cellule stromali tumorali aderenti acquisivano una chiara espressione di mRNA per PPAR- γ e per FABp4, similmente a quella delle BM-MSCs (figura 4A). Inoltre quando queste cellule erano coltivate in presenza di medium osteogenico loro acquisivano una significativa upregolazione dell'mRNA per i markers degli osteoblasti: fosfatasi alcalina (ALP), Run-

related transcription factor 2 (RUNX 2) e osteocalcina (figura 4B). Sulla base di questi risultati, abbiamo denominato le cellule stromali aderenti derivate da HNSCC come “tumor-MSCs”, in analogia alle BM-MSCs.

4.3 Le tumor-MSCs inibiscono, *in vitro*, la proliferazione delle cellule T CD4+ attraverso indolamina 2,3diossigenasi (IDO)

In letteratura, è ben nota l'attività immunosoppressiva delle BM-MSCs su vari tipi cellulari del sistema immunitario ed in particolare verso le cellule T. Per questo abbiamo deciso di valutare se le tumor-MSCs, assomigliando per caratteristiche fenotipiche e potenziale differenziativo alle BM-MSCs, mostrassero anche le stesse proprietà immunoregolatorie. Per valutare ciò, abbiamo co-cultivato le cellule TCD4+ allogeniche stimulate policlionalmente (mAb anti-CD3 più anti-CD28) o stimulate con MLR (mixed lymphocyte reaction) con un numero scalare di tumor-MSCs o di BM-MSCs, quest'ultime cellule utilizzate come condizione di controllo. Al 5° giorno, è stata valutata la capacità dei linfociti di proliferare attraverso la valutazione dell'up-take di 3H-TdR. Come mostrato in figura 5A, l'aggiunta in coltura delle tumor-MSCs, ad alti rapporti tumor-MSCs/cellule T, inibisce significativamente la proliferazione delle cellule T indotta dalla stimolazione con anti-CD3 più anti-CD28 o con MLR. Di nota, il comportamento immunosoppressivo delle tumor-MSCs era comparabile a quello mostrato dalle BM-MSCs. Per definire il meccanismo molecolare alla base dell'immunoregolazione delle tumor-MSCs, abbiamo preso spunto dai nostri precedenti dati riguardanti il ruolo di IDO nell'attività immunoregolatoria delle BM-MSCs umane. In particolare, abbiamo ripetuto gli esperimenti descritti sopra basati sulle co-culture delle cellule T e MSCs, in presenza o in assenza dell'inibitore metyl-tryptophano. Come mostrato in figura 5B, questo composto aboliva significativamente l'attività immunoregolatoria delle tumor-MSCs, in maniera dose-dipendente, dimostrando il ruolo di IDO nel meccanismo molecolare della immunoregolazione delle tumor-MSCs.

4.4 La frequenza delle cellule stromali CD90+ nel HNSCC correla direttamente con le dimensioni del tumore

Per cercare di capire il possibile ruolo delle tumor-MSCs nella crescita dei tumori HNSCC, abbiamo utilizzato i dati riguardanti la frequenza delle cellule CD90+ nei campioni tumorali. La natura mesenchimale di queste cellule era confermata dall'analisi citofluorimetrica valutando la co-espressione di CD29, CD73 e CD105, in assenza di CD133, CD45, CD31, CD14 e HEA. In particolare la frequenza delle cellule CD90+ analizzate nella sospensione cellulare derivata dal campione tumorale fresco, è stata correlata con le dimensioni del neoplasia, come misurate dalla tomografia computerizzata: diametro longitudinale x laterale x trasversale (cm) x 0.52. Come mostrato in figura 6, la frequenza delle cellule CD90+ correla direttamente e significativamente con il volume del tumore, essendo $R^2=0.4329$, $p<0.01$ ed inversamente con la frequenza dei leucociti infiltranti il tumore (cellule CD45+): $R^2=0.44$ con un valore di $p<0.01$. Infine è stato osservato un trend positivo nella correlazione tra le cellule CD90+ e le cellule endoteliali CD31+: $R^2=0.2537$.

5. DISCUSSIONE

Le MSCs sono componenti essenziali dello stroma tumorale, e giocano un ruolo centrale nel microambiente tumorale, modulando la crescita e lo sviluppo del tumore. Tali cellule sono capaci di diventare fibroblasti associati al tumore (TAFs), che contribuiscano all'espansione del network fibrovascolare e alla progressione tumorale. Le MSCs sono anche in grado di agire come precursori di cellule endoteliali e di periciti e promuovere, anche attraverso la produzione di fattori solubili, l'angiogenesi e la linfogenesi. Generalmente, si ritiene che le MSCs raggiungano il tumore dal midollo osseo, in quanto una forte evidenza dimostra che le MSCs migrano al sito di danno in varie condizioni patologiche, incluse l'infiammazione, la riparazione tissutale e i neoplasmi. Durante la progressione e lo sviluppo dei tumori, un gran numero di MSCs possano essere reclutate al sito tumorale. Inoltre, è ben noto che le BM-MSCs possiedono proprietà immunoregatorie su varie cellule del sistema immunitario, in modelli *in vitro* e *in vivo* sia animali che umani.

Nel presente studio, abbiamo ipotizzato che le MSCs o cellule con proprietà simili alle MSCs presenti nel HNSCC potessero presentare attività immunoregatoria, similmente a quelle del midollo osseo, favorendo la crescita e la progressione e anche le metastasi a distanza. Nella prima fase dello studio quindi, abbiamo valutato mediante analisi citofluorimetrica la relativa proporzione di cellule appartenenti alla linea stromale/mesenchimale (CD90+), di cellule di origine endoteliale (CD31+), di cellule di origine epiteliale (HEA+) e di leucociti (CD45+). Le cellule stromali CD90+ erano significativamente arricchite nei campioni di tessuto tumorale appena isolato rispetto ai tessuti sani, mentre non sono state notate differenze significative per gli altri markers. Inoltre abbiamo dimostrato che è possibile derivare dal HNSCC, colture di cellule omogenee che ricordano le classiche BM-MSC in termini di morfologia, immunofenotipo, e potenziale differenziativo. In particolare le cellule stromali erano isolate dai campioni tumorali seguendo le raccomandazioni dell'International Society for Cell Therapy (2005) per l'isolamento di BM-MSCs. La valutazione morfologica delle cellule coltivate era fatta mediante microscopia confermando la forma simile a fibroblasti. L'immunofenotipo di queste cellule era valutato mediante citometria a flusso per l'espressione di CD44, CD105, CD73, CD90, CD29, CD31, CD45, CD14, CD34, HEA. I risultati dimostravano che le cellule aderenti isolate dai campioni tumorali erano omogeneamente caratterizzate dallo

stesso fenotipo delle BM-MSCs ottenute da donatori sani. Allo scopo di valutare la capacità funzionale delle tumor-MSCs di differenziare verso specifici lineages di cellule stromali, queste sono state coltivate in presenza di appropriati medium differenziativi per la differenziazione osteoblastica ed adipoblastica. Dopo adeguata coltura cellulare siamo stati capaci di dimostrare entrambe le differenziazioni cellulari in termini sia di immunoistochimica che di espressione di specifici mRNA, come valutato mediante real time quantitative RT-PCR. Quindi, abbiamo concluso che le tumor-MSCs condividono con le BM-MSCs caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche e differenziative.

Successivamente, abbiamo valutato, *in vitro*, le proprietà immunoregatorie delle tumor-MSCs. A questo scopo, abbiamo co-coltivato un numero scalare di tumor-MSCs con cellule T CD4⁺ stimulate o con anti-CD3 più anti-CD28 o con MLR e poi abbiamo misurato l'attività proliferativa dei linfociti mediante incorporazione di timidina triziata dopo 5 giorni di coltura. I risultati di questo esperimento dimostravano che le tumor-MSCs inibivano significativamente, a più alti rapporti MSC/linfociti (1/5 e 1/10), la proliferazione *in vitro* delle cellule T CD4⁺, allo stesso modo delle BM-MSCs di controllo. Inoltre, abbiamo dimostrato che le tumor-MSCs condividono con le BM-MSCs, uno dei principali meccanismi molecolari della soppressione immunitaria: l'attività enzimatica di IDO. Com'è noto, questo enzima è responsabile del catabolismo dell'amminoacido essenziale triptofano, generando il composto tossico kinineurina che è sia inibitorio per la proliferazione cellulare che pro-apoptotico. In particolare, abbiamo dimostrato che l'aggiunta in coltura del 6-methyl-triptophano, inibitore di IDO abolisce l'effetto inibitorio delle tumor-MSCs sulla proliferazione delle cellule T. Presi insieme questi dati dimostrano che l'attività immunoregatoria delle tumor-MSCs è quantitativamente e qualitativamente comparabile con quella delle BM-MSCs. Su queste basi, abbiamo ipotizzato che anche le tumor-MSCs potessero possedere un'attività immunoregatoria *in vivo* come già dimostrato nelle BM-MSCs. Per verificare questa ipotesi abbiamo valutato la correlazione tra la frequenza delle tumor-MSCs presenti nei campioni tumorali e le dimensioni del tumore; da tale analisi è emersa una correlazione diretta e significativa tra i due parametri, suggerendo che le tumor-MSCs favoriscono la crescita della neoplasia. Inoltre, abbiamo osservato una correlazione inversa e significativa tra le tumor-MSCs ed i leucociti totali infiltranti il tumore, suggerendo così che le tumor-MSCs potessero esercitare anche un'attività immunoregatoria *in vivo*, come già mostrato nei modelli *in vitro*, sia nei modelli murini che negli umani con riguardo alle BM-MSCs.

In conclusione i nostri studi hanno dimostrato che nei tumori testa-collo la popolazione di cellule MSCs è arricchita quando comparata ai tessuti sani di controllo, e condivide con le convenzionali BM-MSCs sia l'immunofenotipo che il potenziale differenziativo. Quindi, queste cellule sono in grado di agire, a livello tumorale, come progenitori stromali implicati nella generazione di differenti tipi cellulari del tessuto connettivo.

Le tumor-MSCs mostrano attività immunosoppressiva in modelli *in vitro*, essendo capaci di abrogare la proliferazione di cellule T sia con la stimolazione policlonale che con la stimolazione MLR. Inoltre, il meccanismo molecolare alla base di questa attività immunoregolatoria è principalmente correlato all'attività di IDO, come già dimostrato per le convenzionali BM-MSCs, di cui è ben documentata l'attività immunosoppressiva *in vivo*. Questi dati insieme con l'osservazione che la frequenza delle tumor-MSCs correla direttamente con le dimensioni del tumore e correla inversamente con il numero dei leucociti infiltranti il tumore, ci porta ad ipotizzare che le tumor-MSCs potrebbero favorire la crescita del tumore, probabilmente inibendo direttamente o indirettamente la risposta immune. Riteniamo necessario confermare questi dati con un maggior numero di pazienti e correlare la frequenza delle tumor-MSCs con la storia clinica della malattia per un adeguato periodo di follow-up.

6. FIGURE E TABELLE

| Pazienti | Sesso | Età (anni) | Sede del tumore | Stadio TNM | Volume Del tumore (cc) | Precedente RT-CHT | Follow -up (mesi) |
|----------|-------|------------------|--------------------|---------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------|
| # 1 | F | 51 | laringe | pT3N0M0 | 12,74 | No | 25 |
| # 2 | M | 64 | lingua | pT1N0M0 | 0,8736 | No | 25 |
| # 3 | M | 66 | laringe | pT3N2cM0 | 4,94 | No | 25 |
| # 4 | M | 71 | laringe | pT1N1aM0 | 0,52 | No | 24 |
| # 5 | F | 65 | Pavimento orale | pT4bN1M0 | 1,04 | No | 23 |
| # 6 | M | 76 | Pavimento orale | T4bN0M0 | 22,23 | No | 21 |
| # 7 | M | 64 | laringe | pT2N0M0 | 0,0364 | No | 21 |
| # 8 | M | 57 | tonsilla | pT3N2cM0 | 15,6 | No | 20 |
| # 9 | M | 47 | lingua | pT2N0M0 | 6,864 | No | 15 |
| # 10 | F | 66 | tonsilla | pT2N2cM0 | 1,95 | No | 13 |
| # 11 | F | 66 | laringe | pT2N1M0 | 0,39 | No | 8 |
| # 12 | F | 65 | laringe | pT3N1M0 | 0,676 | No | 10 |
| # 13 | M | 60 | laringe | pT4aN2bM0 | 2,184 | No | 9 |
| | 8M/5F | 62.8 ± 7.8 SD | | | | | 18.4 ± 6.5 SD |

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti.

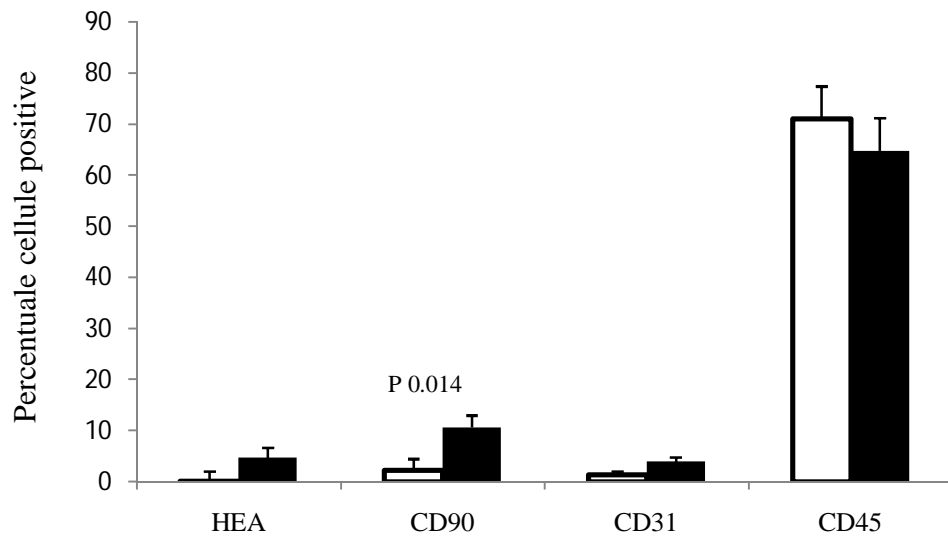


Figura 1: Nel HNSCC c'è un arricchimento di cellule CD90+. La frequenza di cellule HEA+, CD90+, CD31+ e CD45+ è stata valutata mediante citofluorimetria su sospensioni cellulari ottenute da campioni biotici derivati da pazienti affetti da HNSCC (colonne nere, n=13) o su tessuti di controllo sano (colonne bianche, n=6). I dati illustrati rappresentano le medie \pm ES. I valori di p sono indicati quando sono significativi.

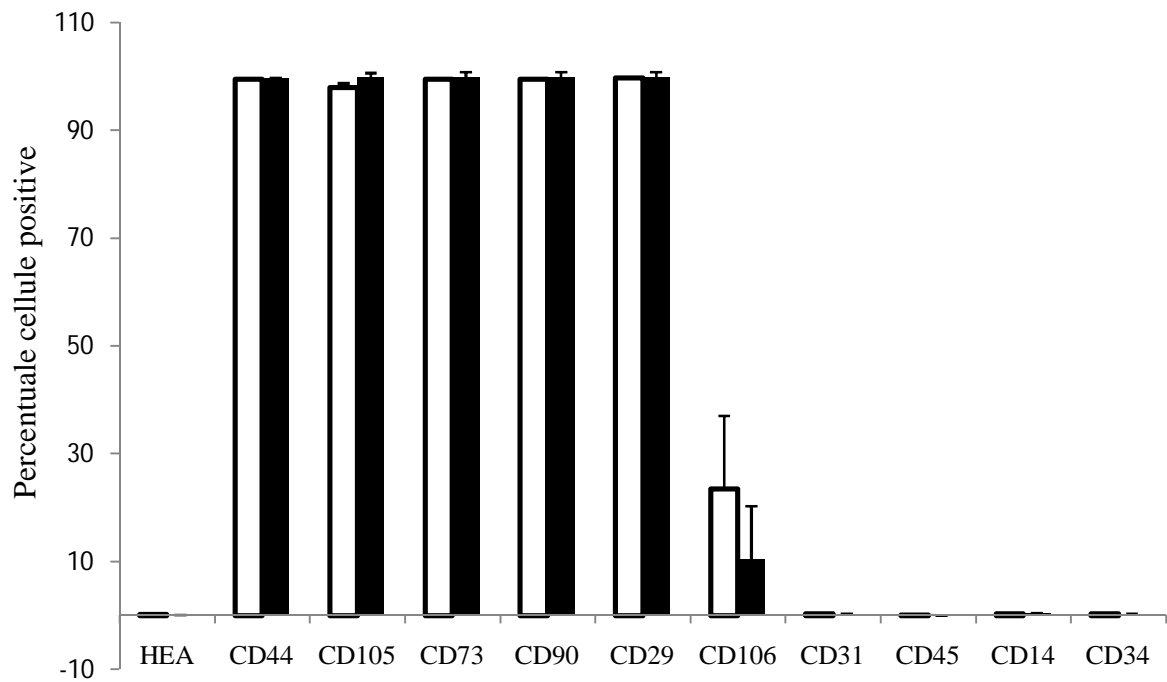


Figura 2: Le cellule stromali derivate dal tumore e le BM-MSCs usate come controllo condividono lo stesso immunofenotipo. Le cellule stromali aderenti ottenute dopo almeno tre settimane di coltura da 7 pazienti (colonne nere) sono state valutate mediante citofluorimetria per i markers caratteristici delle MSCs, e comparate alle BM-MSCs di controllo ottenute da 3 differenti donatori sani (colonne bianche). I dati illustrati rappresentano le medie \pm ES, $p=NS$.

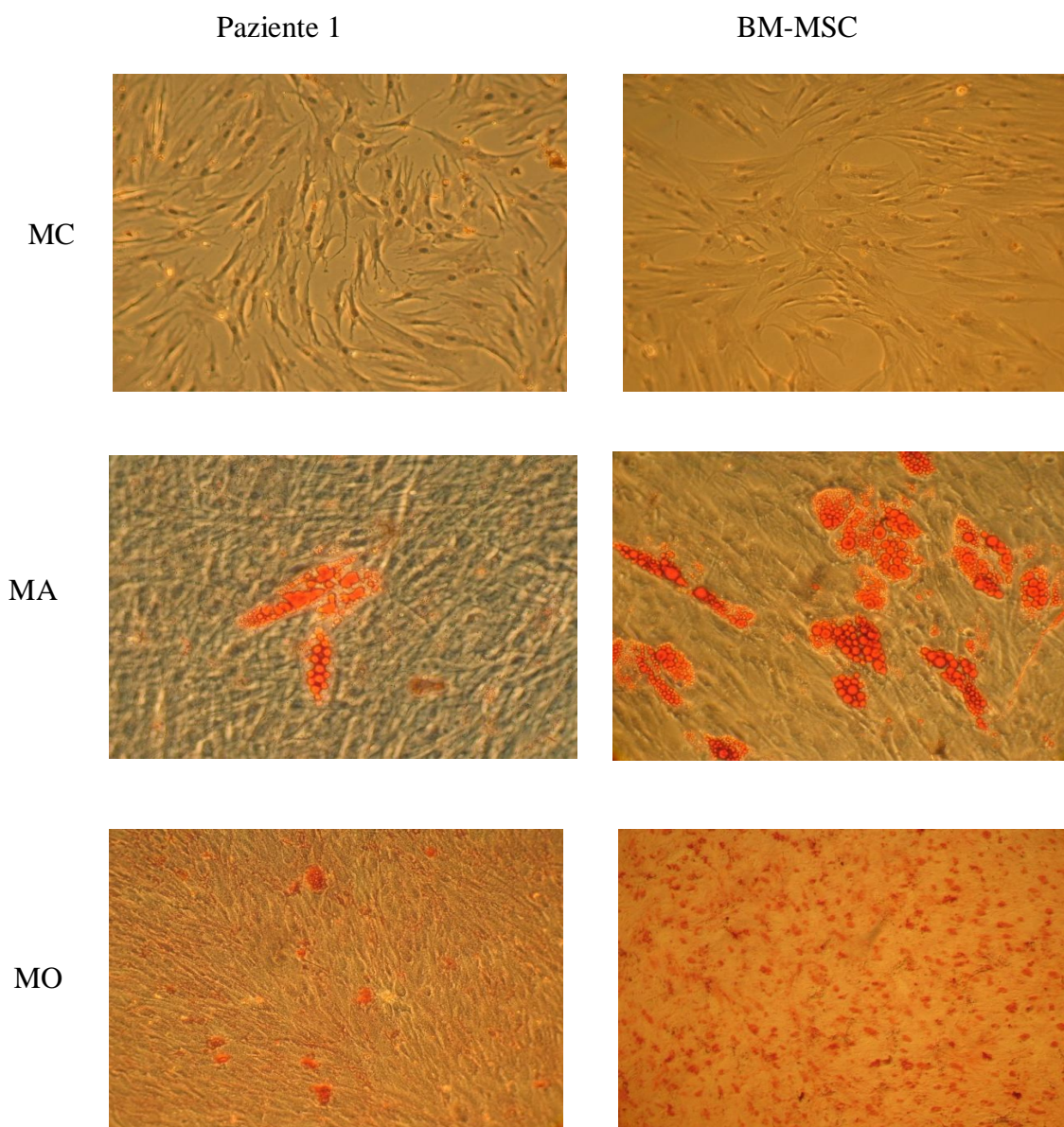
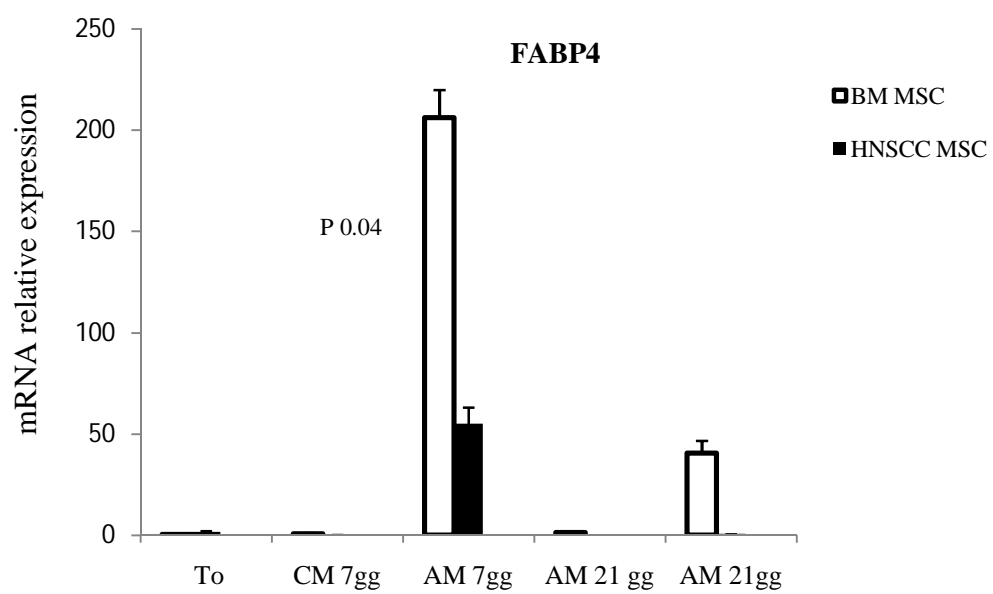
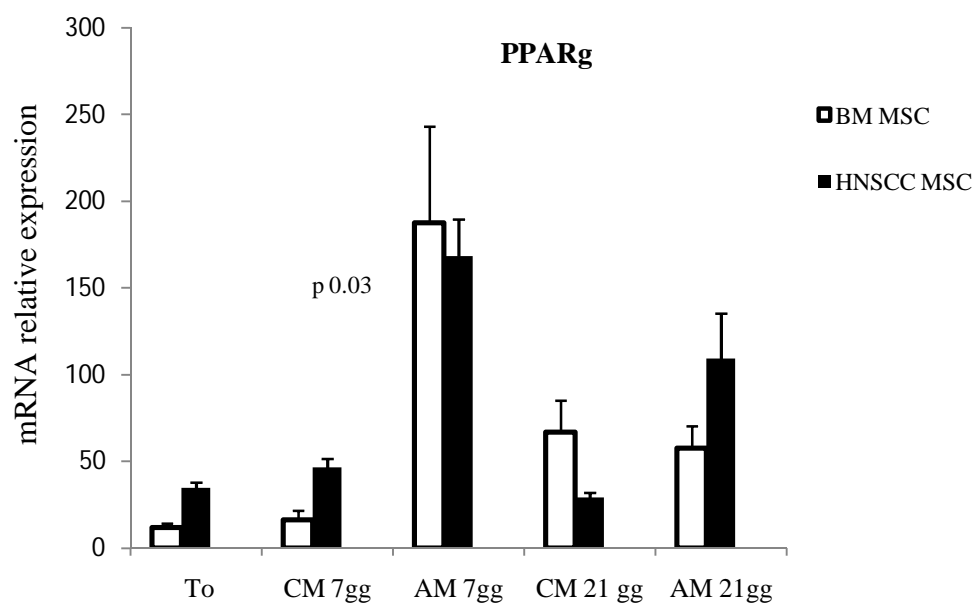
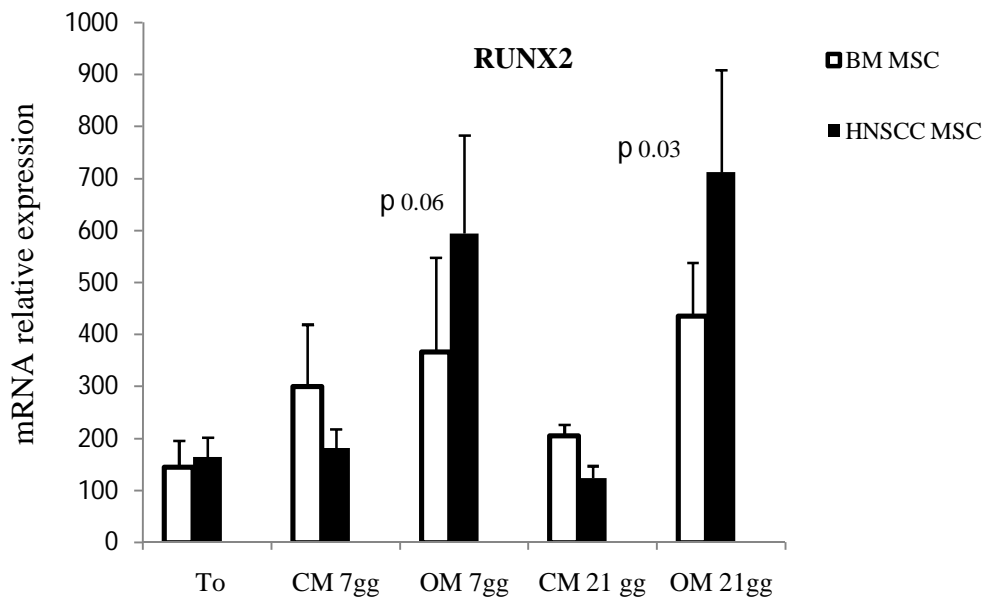
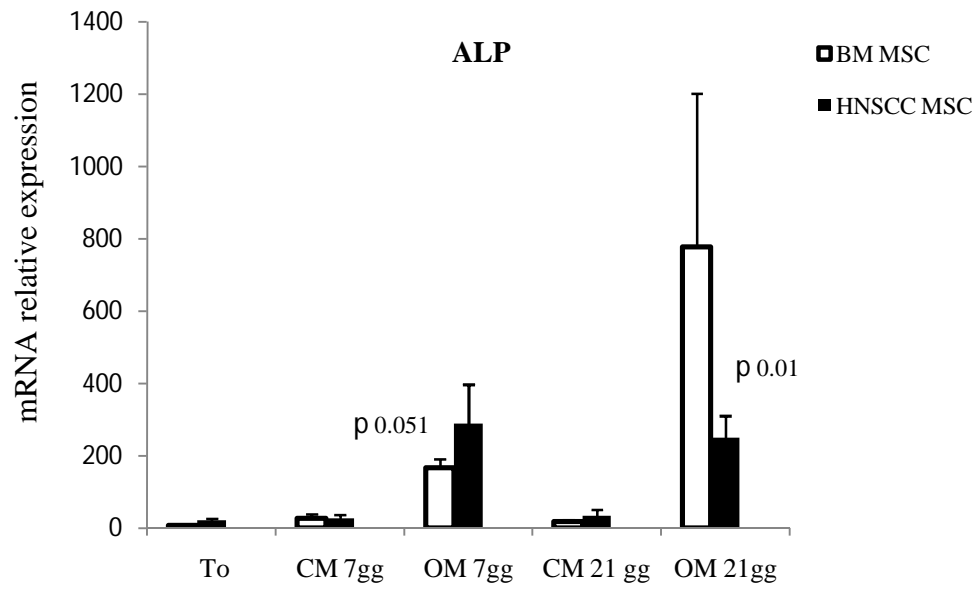


Figura 3: Le cellule stromali aderenti derivate dai campioni tumorali acquisiscono, dopo adeguate condizioni di coltura in vitro, la colorazione tipica degli adipoblasti o degli osteoblasti. Le cellule aderenti derivate da campioni di 6 pazienti affetti da HNSCC o le BM-MSK di controllo, erano coltivate o nel normale medium di coltura (CM) o in presenza del medium osteogenico (OM) o del medium adipogenico (AM) per 21 giorni. Dopo questo periodo le cellule stromali derivate dal tumore erano colorate con ematossilina-eosina più Oil Red O o più Alizarin Red e comparate con la BM-MSKs per valutare la loro differenziazione in vitro. Le immagini sono state ottenute mediante un microscopio ottico a contrasto di fase (Axiovert 40C Carl Zeiss) con un ingrandimento 20X. È riportato un caso rappresentativo su 6 (paziente 1) e comparato con un caso di controllo rappresentativo di 3 (BM-MSK).

A



B



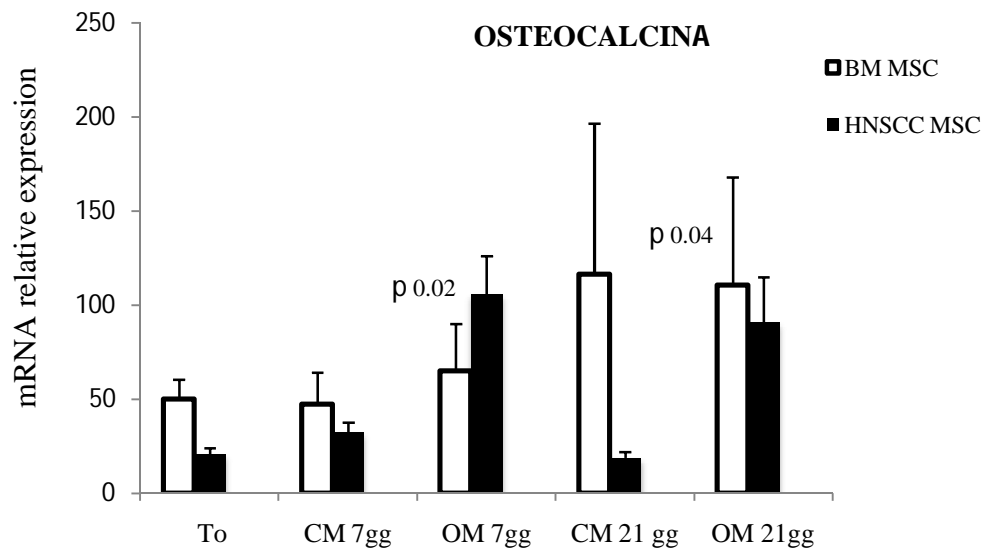


Figure 4: Le cellule stromali aderenti derivate dai campioni tumorali acquisiscono, dopo adeguate condizioni di coltura in vitro, mRNAs tipici degli adipoblasti o degli osteoblasti. I livelli di mRNA per i markers tipici degli adipoblasti o degli osteoblasti sono stati valutati nelle cellule stromali aderenti derivate da HNSCC (colonne nere, n=6) o nelle BM-MSCs (colonne bianche, n=3) al tempo 0, dopo 7 giorni e dopo 21 giorni di coltura in presenza del normale medium di coltura (CM), o del medium adipogenico (AM) o del medium osteogenico (OM). Il pannello A riporta le medie degli mRNAs per i marker adipocitari PPAR- γ e FABp4 a differenti tempi di coltura. Il pannello B mostra le medie degli mRNA per ALP (alkaline phosphatase), RUNX 2 (Runt-related transcription factor 2) e osteocalcina. I valori di p sono indicati quando sono significativi.

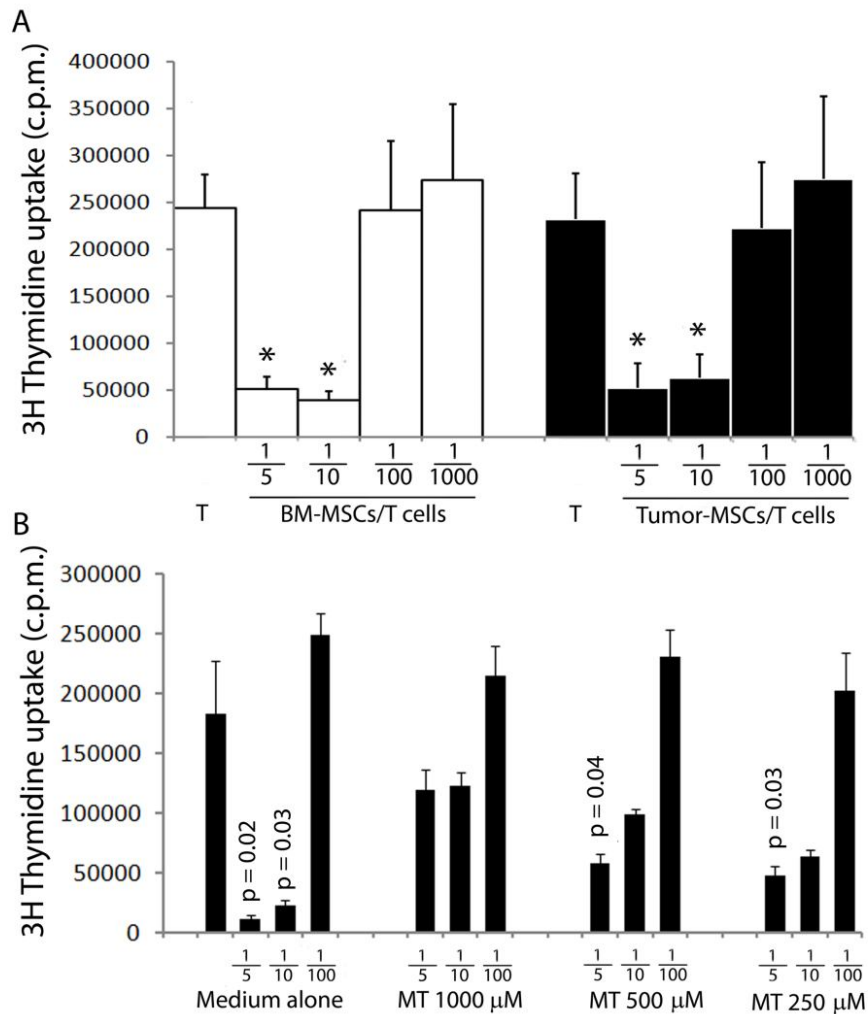


Figura 5: Pannello A: Le Tumor-MSCs inibiscono, *in vitro*, la proliferazione cellulare di linfociti T CD4+ stimolati policlionalmente. La proliferazione cellulare di linfociti T stimolati policlionalmente (anti-CD3 più anti-CD28) è stata valutata dopo 5 giorni di coltura mediante incorporazione di timidina triziata in assenza (T) o in presenza di un numero scalare di tumor-MSCs (colonne nere) o di BM-MSC (colonne bianche). Gli istogrammi rappresentano le medie±ES di sei differenti esperimenti. * $p < 0.01$.

Pannello B: L'attività dell'enzima IDO è alla base dell'attività immunoregolatoria delle tumor-MSCs. La proliferazione cellulare di cellule T stimulate policlionalmente è stata effettuata come precedentemente descritto in assenza o in presenza di tumor-MSCs con o senza il metil-triptofano, inibitore di IDO, in dosi scalari. Gli istogrammi rappresentano le medie±ES di quattro differenti esperimenti. I valori di p sono riportati quando significativi.

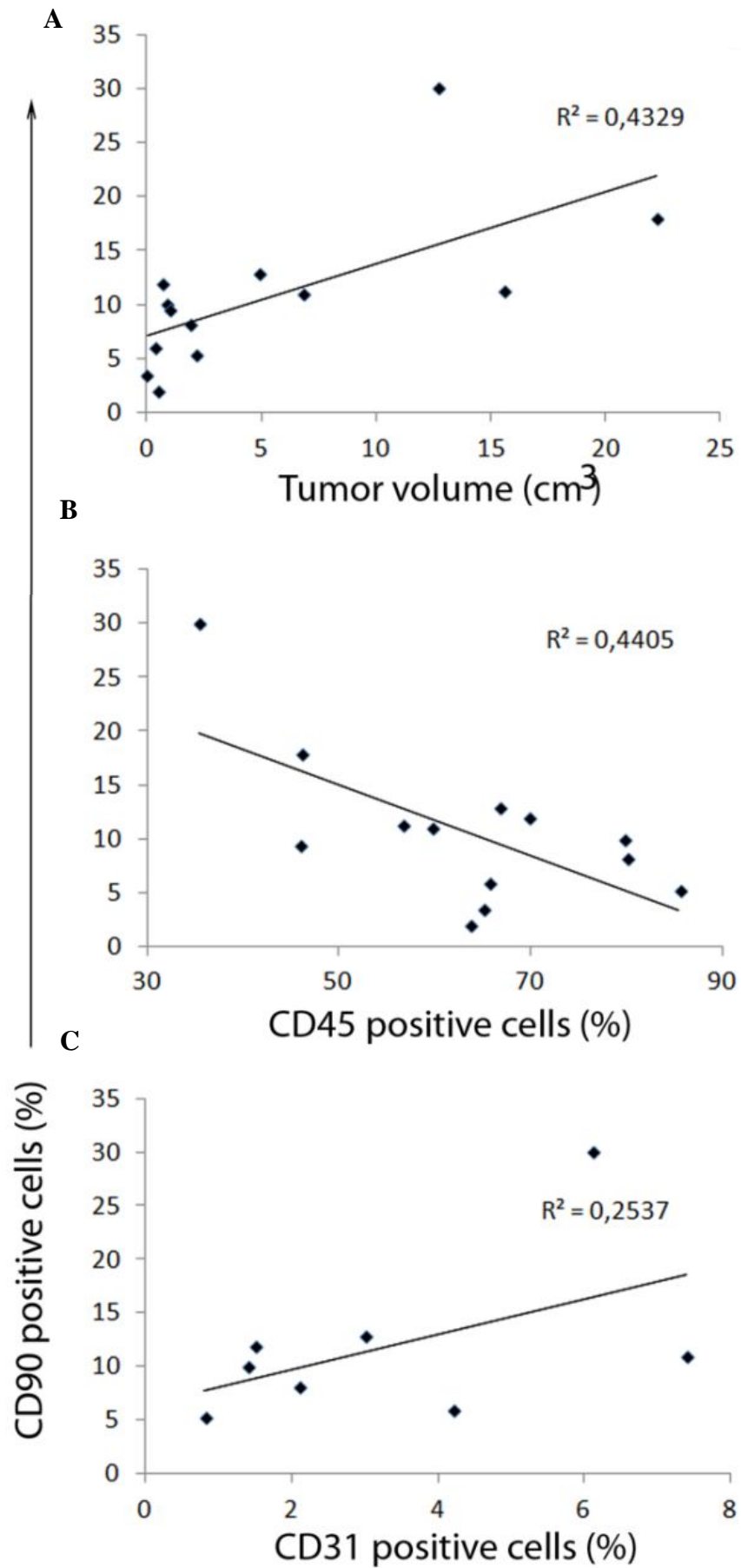


Figura 4: La frequenza delle cellule CD90+ in HNSCC correla direttamente con le dimensioni del tumore ed inversamente con l'infiltrato. Pannello A: La frequenza di cellule CD90+ presente a livello di campioni ottenuti a fresco di HNSCC, come valutato tramite citofluorimetria nella sospensione cellulare, era correlato con le dimensioni del tumore (diametro longitudinale x laterale x trasversale (cm) x 0.52), n=13. **Pannello B:** La frequenza di cellule CD90+, determinata come precedentemente descritto, è stata correlata con la frequenza dei linfociti infiltranti il tumore (cellule CD45+) n=13. **Pannello C:** La frequenza delle cellule CD90+ è stata correlata con la frequenza delle cellule endoteliali (cellule CD45-/CD31+) n=8. Il valore di R^2 è indicato in ogni pannello e valori di p sono riportati quando significativi.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Silverstein A.M. 1989. **A hystory of immunology**. *Academic Press*, San Diego.
2. Abbas A.K. et al. 2005. **Cellular and Molecular immunology**. *W.B. Saunders Company*, Philadelphia Pennsylvania 5th edit.
3. Kubi J. et al. 2006. **Immunology 6th edition**. *MacmillanhigherEducation*.
4. Shortman K. et al. 2002. Mouse and **human dendritic cell subtypes**. *Nature Review in Immunology*. 2:151-161.
5. Michael J. Day 2002. **Clinical immunology of the dog and cat**. *Manson Publishing*, London UK, 2nd edit.
6. Zucker-Frenklin et al. 1988. **Atlas of blood cells: function and pathology**. *Lea &Febiger*, Philadelphia Pennsylvania 2nd edit.
7. Mosmann T.R. et al. 1986. **Two types of murine helper T cell clones. I. Definiction according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins**. *J. Immunology*. 136: 2384-2357.
8. Romagnani S. et al. 1991. **Human Th1 and Th2 subset: doubt no more**. *Immunol. Today*. 12: 256-257.
9. Oppmann et al. 2000. **Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12**. *Immunity*. 13: 715–725.
10. Cua et al. 2003. **Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain**. *Nature*. 421: 744–748.
11. Ivanov et al. 2006. **The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of pro-inflammatory IL-17+ T helper cells**. *Cell*. 126: 1121–1133.
12. Maggi E. et al. 1994. **Th2 like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection**. *J. Exp. Med*. 180: 489-495.
13. Firensteings. et al. 1989. **A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile**. *J. immunol*. 143: 518-525.
14. Zhao RC et al. 2004. **Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy**. *J Lab Clin Med*. 143:284-91.
15. Fridenstein A. 1982 **Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment**. *ArkhPatol*. 44:3–11.

16. Pittenger MF et al. 1999. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science*. 284:143-147.
17. Deans RJ et al. 2000. **Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses.** *ExpHematol*.28:875-884.
18. Javazon EH et al. 2001. **Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells.** *Stem Cells*. 19:219-225
19. Pak HN et al. 2003. **Mesenchymal stem cell injection induces cardiac nerve sprouting and increased tenascin expression in a Swine model of myocardial infarction.** *J CardiovascElectrophysiol*. 14:841-848.
20. Bartholomew A et al. 2001. **Baboon mesenchymal stem cells can be genetically modified to secrete human erythropoietin in vivo.** *Hum Gene Ther*.12:1527-1541.
21. Charbord P et al. 2002. **Comparative study of stromal cell lines derived from embryonic, fetal, and postnatal mouse blood-forming tissues.** *ExpHematol*. 30:1202-1210.
22. Campagnoli C et al. 2001. **Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow.** *Blood*. 98:2396-2402.
23. Anker PS et al. 2003. **Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential.** *Haematologica*.88:845-852
24. Woodbury D et al. 2000. **Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.***J Neurosci Res*.61:364-370.
25. Javazon EH et al. 2004. **Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging.***ExpHemat*. 32:414-425.
26. Friedenstein AJ. 1995. **Marrow stromal fibroblasts.** *Calcif Tissue Int*. 56 (Suppl 1):S17.
27. Haynesworth SE et al.1996. **Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha.** *J Cell Physiol*. 166:585-592.
28. Goshima J et al. 1991. **The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks.** *Clin Orthop*.;269:298-311.

29. Friedenstein AJ et al. 1992. **Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells.** *Bone Miner.* 18:199-213.
30. Krampera M et al. 2003. **Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide.** *Blood.* 101:3722-3729.
31. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. 2000. **Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma.** *Curr Top MicrobiolImmunol.* 251:3-11.
32. Ledbetter JA et al. 1981. **Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocytes helper/inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man.** *J. Exp. Med.* 153:310.
33. Marrack P, Kappler J. 1987. The T cell receptor. *Science.* 238:1073.
34. Swain S. 1983. **Tcell subsets and the recognition of MHC class.** *Immunol. Rev.* 74:129.
35. Uccelli A et al. 2006. **Stem cells in inflammatory demyelinating disorders: a dual role for immunosuppression and neuroprotection.** *Expert OpinBiolTher.* 6(1):17-22.
36. Le Blanc K et al. 2004. **Treatment of severe graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells.** *Lancet.* 363:1439-41.
37. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. 2002. **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *MolBiol Cell.* 13:4279-4295.
38. Maitra B et al. 2004. **Mesenchymal stem cells. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation.** *Transplantation.* 33:597-604.
39. Le Blanc K et al. 2003. **Mesenchymal Stem Cells Inhibite and Stimulated Mixed Lymphocyte Cultures and Mitogenic Responses Indipendently of the Major Histocompatibility Complex.** *Scand J Immunol.* 57:11-20.
40. Bartholomew A et al. 2002. **Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo.** *ExpHemat.* 30:42-48.
41. Frumento G et al. 2002. **Tryptophane-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase.** *J Exp Med.* 196:459-468.

42. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. 2002. **Prostaglandins as modulators of immunity.** *Trend. Immunol.* 23(3):144-150.
43. Aggarwal S., Pittenger M.F. 2005. **Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses.** *Blood.* 105:1815–22.
44. Krampera M. et al. 2006. **Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells.** *Stem Cells.* 24(2):386-98.
45. Waterman R.S., Tomchuck S.L., Henkle S.L., Betancourt A.M. 2005. **A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a proinflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype.** *PLoS One.* 5: 10088.
46. Liotta F. et al. 2008. **Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling.** *Stem Cells.* 26(1):279-89.
47. Corcione A. et al. 2006. **Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions.** *Blood.* 107(1):367–372.
48. Strand S., Galle P.R. 1998. **Immune evasion by tumors: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and clinical implication.** *Mol. Med. Today,* 4:63-68
49. Galon J. Et al. 2006. **Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.** *Science.* 313:1960–1964.
50. Penn I. 1988. **Tumors of the immunocompromised patient.** *Annu. Rev. Med.* 39:63–73.
51. Burnet M. 1970. **The concept of immunological surveillance.** *ProgExp Tumor Res.* 13:1-27.
52. Crowe N.Y., Smyth M.J., Godfrey D.I. 2002. **A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas.** *J. Exp. Med.* 196:119–127.
53. Dunn G.P., Old L.J., Schreiber R.D. 2004. **The three Es of cancer immunoediting.** *Annu. Rev. Immunol.* 22:329–360.
54. Hanahan D. and Weinberg RA. 2000. **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 100:57–70.
55. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. 2006. **Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion.** *Nat. Rev. Immunol.* 6:715–727.
56. Zou W. 2005. **Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance.** *Nat. Rev. Cancer.* 5:263–274.

57. Schwartz RH. 2003. **T cell anergy**. Annu. Rev. Immunol. 21:305–334.
58. Dong H. et al. 2002. **Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion**. Nat. Med. 8:793–800.
59. Tripathi P. and Agrawal S. 2006. **Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression**. Cancer Invest. 24:178–186.
60. Campoli M., Chang C.C., Ferrone S. 2002. **HLA class I antigen loss, tumor immune escape and immune selection**. Vaccine. 20(Suppl. 4):A40–A45.
61. Swann J.B. and Smyth M.J. 2007. **Immune surveillance of tumors**. J. Clin. Invest. 117:1137–1146 doi: 10.1172/JCI31405.
62. Gorelik L. and Flavell R.A. 2001. **Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells**. Nat. Med. 7:1118–1122.
63. Takahashi H. et al. 2006. **FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes**. Clin. Cancer Res. 12:3265–3271.
64. Shin M.S. et al. 2001. **Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers**. Cancer Res. 61:4942–4946.
65. Kusmartsev S. and Gabrilovich D.I. 2006. **Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer**. Cancer Immunol. Immunother. 55:237–245.
66. Terabe M. and Berzofsky J.A. 2004. **Immunoregulatory T cells in tumor immunity**. Curr. Opin. Immunol. 16:157–162.
67. Munn D.H. and Mellor A.L. 2007. **Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance**. J. Clin. Invest. 117:1147–1154 doi: 10.1172/JCI31178.
68. Patel S.A. et al. 2010. **Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta**. J Immunol. 184:5885–5894.
69. Hung S.C. et al. 2007. **Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis**. Stem Cells. 25:2363–2370.

70. Mishra P.J. et al. 2008. **Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells.** Cancer Res. 68:4331-4339.
71. Dawson M.R., Chae S.S., Jain R.K., Duda D.G. 2011. **Direct evidence for lineage-dependent effects of bone marrow stromal cells on tumor progression.** AM J Cancer Res 1:144-154.
72. Karnub A.E. 2007. **Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis.** Nature. 449:557-563.
73. Ramasamy R. et al. 2007. **Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on *in vivo* tumor growth.** Leukemia 21:304-310.
74. Qiao L. et al. 2008. **Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model.** Cell Res. 18:500-507.
75. Scherzed A. et al. 2011. **BMMSC enhance the survival of paclitaxel treated squamous cell carcinoma cells *in vitro*.** Cancer Biol Ther. 11:349-357.
76. Teng I.W. et al. 2011. **Targeted methylation of two tumor suppressor genes is sufficient to transform mesenchymal stem cells into cancer stem/initiating cells.** Cancer Res. 71:4653-4663.
77. Bian Z.Y. et al. 2009. **Increased number of mesenchymal stem cell-like cells in peripheral blood of patients with bone sarcomas.** Arch Med Res. 40: 163-168.
78. Warnakulasuriya S. 2009. **Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer.** Oral Oncology. 45: 309-316.
79. Scully C., Bagan J. 2009. **Oral squamous cell carcinoma overview.** Oral Oncology. 45: 301-308.
80. Zhang P. et al. 2009. **Side population in oral squamous cell carcinoma possesses tumor stem cell phenotypes.** Cancer Letters. 277:227-234.
81. McCullough M.J. et al. 2010. **Oral mucosal malignancy and potentially malignant lesions: an update on the epidemiology, risk factors, diagnosis and management.** Australian Dental Journal. 55:61-65.
82. Prince M.E.P., Ailles L.E. 2008. **Cancer stem cells in head and neck squamous cell cancer.** Journal of Clinical Oncology. 26:2871-2875.

83. Chiou S.H.. et al. 2008. **Positive correlation of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma.** *ClinicalCancerResearch*. 14:4085-4095.
84. Liebertz D.J. et al. 2010. **Establishment and characterization of a novel head and neck squamous cell carcinoma cell line USC-HN1.** *Head and NeckOncology*. 46:116-122.
85. Harper L.J. et al. 2010. **Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an estende G2 cell Cycle phase that is associated with apoptotic resi stance.** *BMC Cancer*. Vol. 10.
86. Joyce J.A., Pollard J.W. 2009.**Microenvironmental regulation of metastasis.** *NatRev Cancer*.9(4):239–252
87. De Boeck A. et al. 2010.**Resident and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in head and neck squamous cell carcinoma.***Oral Oncology*. 46: 336-342.
88. Direkze N.C. et al. 2004. **Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts.***Cancer Res*. 64(23):8492–8495
89. Ishii G. et al. 2003. **Bone-marrow-derived myofibroblasts contribute to the cancer-induced stromal reaction.** *BiochemBiophys Res Commun*. 309(1):232–240.
90. Ponte A.L. et al.2007. **The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities.** *Stem cells*. 25(7):1737–1745
91. Ries C., Egea V., Karow M., Kolb H., Jochum M., Neth P. 2007. **MMP-2, MTI-MMP, and TMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines.** *Blood*.109(9):4055–4063
92. Karnoub AE et al. 2007.**Mesenchymal stem cells within tumourstroma promote breast cancer metastasis.***Nature*. 449(7162):557–563
93. Eisma R.J., Spiro J.D., Kreutzer D.L. 1999. **Role of angiogenic factors: coexpression of interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in patients with head and neck squamous carcinoma.** *Laryngoscope*. 109(5):687–693

94. Lozito T.P., Kuo C.K., Taboas J.M., Tuan R.S. 2009. **Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix.** *J Cell Biochem.* 107(4):714–722
95. Oswald J. et al. 2004. **Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro.** *Stem cells.* 22(3):377–384
96. Kinnaird T. et al. 2004. **Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms.** *Circ Res.* 94(5):678–685
97. Beasley N.J.P. et al. 2002. **Intratumorallymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer.** *Cancer Res.* 62(5):1315–1320
98. Stacker S.A., Achen M.G., Jussila L., Baldwin M.E., Alitalo K. 2002. **Lymphangiogenesis and cancer metastasis.** *Nat Rev Cancer.* 2(8):573–583
99. Kishimoto K. et al. 2003. **Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma.** *Oral Oncol.* 39(4):391–396.
100. Conrad C. et al. 2009. **Multipotentmesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo.** *Circulation.* 119(2):281–289.
101. Yu H., Kortylewski M., Pardoll D. 2007. **Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment.** *Nat. Rev. Immunol.* 7:41–51.
102. Whiteside T.L. 2005. **Immunobiology of head and neck cancer.** *Cancer Metastasis Rev.* 24(1):95–10.
103. De Wever O., Demetter P., Mareel M., Bracke M. 2008. **Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth.** *Int J Cancer.* 123(10):2229–2238
104. Vered M. et al. 2010. **Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer.** *Cancer Sci.* 101(1):274–80
105. Rehman A.O., Wang C.Y. 2008. **SDF-1alpha promotes invasion of head and neck squamous cell carcinoma by activating NF-kappaB.** *J BiolChem.* 283(29):19888–19894
106. Chung C.H. et al. 2006. **Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor- κ B signaling as**

characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Res. 66(16):8210–8218.